

**O OBESOGÊNICO TRIBUTILESTANHO INDUZ
ADIPOGÊNESE ANORMAL NOS OVÁRIOS DE RATAS
ADULTAS**

Julia Fernandez Puñal de Araújo

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas

**Mestrado em Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo**

Vitória, Abril de 2018

JULIA FERNANDEZ PUÑAL DE ARAÚJO

O OBESOGÊNICO TRIBUTILESTANHO INDUZ ADIPOGÊNESE ANORMAL NOS OVÁRIOS DE RATAS ADULTAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Jones Bernardes

Graceli

Co-orientador: Dr. Leandro Ceotto

Freitas Lima

VITÓRIA - ES

2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do
Espírito Santo, ES, Brasil)
Bibliotecário: Rafael Lima de Carvalho – CRB-6 MG-002926/O

Araújo, Julia Fernandez Puñal de, 1992 -
A663o O obesogênico tributilestano induz adipogênese anormal nos ovários
de ratas adultas / Julia Fernandez Puñal de Araújo - 2018.
77 f. : il.

Orientador: Jones Bernardes Graceli.
Coorientador: Leandro Ceotto Freitas Lima.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal
do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Poluição Ambiental. 2. Adipogenia. 3. Ovário. 4. Ratos. I. Graceli,
Jones Bernardes. II. Lima, Leandro Ceotto Freitas. III. Universidade Federal
do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 612



**Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Universidade Federal do Espírito Santo
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas**

Registro de Julgamento de Dissertação de Mestrado

A Comissão Julgadora que examinou a Dissertação de Mestrado da candidata **Julia Fernandez Puñal de Araujo**, intitulada "**O Obesogênico Tributilestanho Induz Adipogênese Anormal nos Ovários de Ratas Adultas**", decidiu, por unanimidade, aprovar a referida Dissertação de Mestrado. Dessa forma, a candidata cumpriu todos os requisitos descritos no Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas e, portanto, a Comissão Julgadora declara que a aluna faz jus à obtenção do Grau de Mestra em Ciências Fisiológicas.

Vitória – ES, 20 de abril de 2018.

**PROF. DR. ROGER LYRIO DOS
SANTOS**

Presidente da Comissão Julgadora - Programa de Pós-
Graduação em Ciências Fisiológicas

Prof. Dr.ª SONIA ALVES GOUVEA
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em
Ciências Fisiológicas

Prof. Dr. JONES BERNARDES GRACELI
Orientador

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a minha família, em especial, meus pais **Mercedes e Paulo**, que me passaram os valores que me fizeram a pessoa que sou hoje, muitas vezes se sacrificando em benefício das filhas, além de todo o suporte que me deram durante minha vida acadêmica; minha irmã **Raquel**, que apesar das diferenças e da distância, sempre se mostrou uma grande amiga e grande companheira, me dando forças e me apoiando em muitos momentos difíceis ao longo desses anos, principalmente nesses últimos dois anos.

Ao meu namorado **Matheus**, que no último ano me apoiou e me ajudou a seguir em frente nos momentos de dificuldade, ansiedade e surtos. Além de me incentivar a buscar sempre a minha felicidade e não me deixar esquecer meu potencial, mesmo quando outros me faziam pensar o contrário. Agradeço por todo o carinho que tem demonstrado.

A **Jessica e Talita**, por toda a amizade, carinho e por estar sempre perto, mesmo estando longe. Agradeço por toda a compreensão, sempre entendendo quando não podia sair pois tinha que tratar rato ou fazer algum experimento.

Aos grandes amigos que fiz na Biologia. Muito mais do que amigos, friends. Me ensinaram a ver a vida de um modo diferente, me ajudando a crescer muito ao longo da graduação, além de sempre me ajudarem a ver que preciso de lazer, não só de laboratório. Ao **Carlos, Livia, Emanuela, Igor, Margarida e Matheus Dalbem**, que se mostraram grandes amigos mesmo após o término da graduação.

Aos amigos de laboratório, por transformar as horas que passamos trabalhando em momentos descontraídos e divertidos. A **Priscila**, por todos os ensinamentos, orientações, conversas, ajudas e choros divididos ao longo desses 6 anos. A **Gabriela**, por sempre estar disposta a ajudar e por todas as conversas divertidas que tivemos, além de excelente guia na Disney. A **Isabela**, que chegou quietinha e se mostrou uma fofa, e sempre escutou meus lamentos. Ao **Eduardo**, que sempre foi um bom companheiro, e apesar das diferenças, sempre nos entendemos no final. A todos os demais alunos do laboratório: **Neuza, Ludmila, Charles, Oscar, Julia Ayub, Amanda, Tiago e todos os outros** que tornaram o ambiente do laboratório mais agradável, além da ajuda que sempre me deram.

Aos meus colegas do mestrado, que com brincadeiras e companheirismo deixam as disciplinas mais agradáveis. Além dos grupos de estudo, debates e ajuda durante as aulas.

As professoras **Tânia** e **Suemi**, que são duas pessoas maravilhosas que a vida me permitiu ter contato. Vocês me deram um suporte enorme, tanto na parte profissional, como na parte pessoal. Sou muito grata por terem tirado um tempinho para me escutar e tentar me orientar.

Ao **prof. Jones**, pela oportunidade. Por ter me acolhido para o mestrado, e pela confiança que depositou em mim. Além das orientações e correções dos artigos e trabalhos que produzi durante os últimos 6 anos.

As **Ratas**, que são a parte mais importante dessa pesquisa. Mesmo que eu tenha procurado tratá-las com respeito e carinho, elas foram eutanasiadas para a realização desse trabalho.

A **UFES, CAPES, FAPES e CNPq**, pelo apoio financeiro que possibilitou a realização desse trabalho.

“A escuridão me pegou e vaguei fora do pensamento e do tempo,
as estrelas giravam acima e cada dia era tão longo quanto
a idade da terra. Mas não era o fim, senti vida em mim
novamente, havia sido enviado de volta até
cumprir minha tarefa”

Gandalf, o branco (J.R.R. Tolkien)

SUMÁRIO

RESUMO.....	16
ABSTRACT.....	17
1 – INTRODUÇÃO	18
2 – OBJETIVOS	26
2.1 - Objetivo Geral	26
2.2 – Objetivos Específicos	26
3 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1 – Modelo Experimental.....	27
3.1a – Grupos Experimentais.....	27
3.2 – Avaliação do Ciclo Estral das Ratas	28
3.3 – Avaliação dos Pesos dos Órgãos	29
3.4 – Avaliação dos Níveis Séricos Hormonais	29
3.5 – Avaliação Histológica dos Ovários e Úteros	29
3.5a – Hematoxilina e Eosina.....	30
3.5b – Alcian Blue.....	30
3.5c – Picro-sirius Red.....	31
3.6 – Oil Red O.....	31
3.7 – Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	31
3.8 – Análises Bioquímicas.....	32
3.8a – Atividade de Mieloperoxidase (MPO).....	32
3.8b – Atividade de N-acetil-b-D-glicosaminidase (NAG).....	32
3.8c – Atividade da Glutathione Redutase (GSH).....	32
3.9 – Avaliação do estresse oxidativo.....	33
3.10 – RT-qPCR.....	33
3.11 – Western Blotting.....	34
3.12 – Análise Estatística.....	35
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1 – Ciclo Estral, Dosagem Hormonal e Pesos dos Órgãos	36
4.2 – Análise Histológica	42
4.3 – Análise Inflamatória.....	50
4.4 – Análise do Estresse Oxidativo.....	53

4.5 – Análise da Deposição de Colágeno.....	55
4.6 - Análise da Correlação entre os marcadores adipogênicos ovarianos, esteroidogênese, inflamação do trato reprodutivo e estresse oxidativo.....	55
5 – CONCLUSÕES	60
6 – REFERÊNCIAS	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Os ratos TBT têm um ciclo estral anormal. (A) A representação gráfica do ciclo estral nos ratos CON e TBT, determinada por citologia vaginal durante 30 dias (n = 10). (B) Uma representação gráfica do número de dias em cada estágio do ciclo estral e do comprimento total do ciclo. Proestro (P), estro (E), metaestro-diestro (M-D). * p<0.05, ** p<0.01 vs. CON (teste t de *Student*).....36

Figura 2: Gonadotrofinas, hormônios sexuais ovarianos e expressão enzimática esteroidogênica em ratas (n = 5). (A) Níveis basais séricos de FSH. (B) Níveis basais séricos de LH. (C) Aumento dos níveis séricos de progesterona nos ratos TBT. (D) expressão de mRNA de StAR no ovário das ratas CON e TBT. (E) Aumento dos níveis séricos de testosterona no grupo TBT. (F) Aumento da expressão da proteína CYP11A1 nos ovários TBT. (G) Redução dos níveis séricos de estrogênio nas ratas TBT. (H) Expressão reduzida de mRNA da aromatase nos ovários das ratas TBT. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. CON (teste t de *Student*). StAR: proteína reguladora aguda esteroidogênica. CYP11A1: enzima de clivagem da cadeia lateral de colesterol.....41

Figura 3: A morfologia do ovário das fêmeas (n = 5). As seções representativas dos ovários TBT (A, A1, A2) e (B, B1, B2, B2.1, B3, B3.1) foram coradas com H & E, foi indicado o corpo lúteo (CL), os folículos císticos (Cys), folículos antrais (An), folículos atresícos (At), células inflamatórias (asterisco) e células apoptóticas (seta). (C) Aumento dos folículos de Cys de ovário TBT. (D) Aumento dos folículos atresícos nos ovários TBT. (E) Diminuição do número CL nos ovários TBT. (F) Aumento da expressão da proteína PPAR γ nas ratas TBT. (G) Aumento da expressão de mRNA C/EBP- β . (H) Aumento da expressão de mRNA Lipin-1. (I) Diminuição da expressão da proteína ER α do ovário nos ratos TBT. * p<0.05, ** p<0.01 vs. CON (teste t *Student*). Barra = 100 μ m (A, A1, A2, B, B1, B2, B3). Barra = 12,5 μ m (B2.1, B3, B3.1). Oo: Oócito. Gr: célula granulosa. Th: célula de Teca.....44

Figura 4: (A, B, C, D) Os folículos primordiais, primários, pré-antrais e antrais ovarianos de CON e TBT, expressos como unidades por área (mm^2). (E, F) A área tecal e granulosa dos ovários CON e TBT, analisada e representada como área/folículo (μm^2). (teste t *Student*)46

Figura 5: Foram obtidas seções com gotículas lipídicas representativas dos ovários a partir de ratas (A) CON e (C) TBT- usando a coloração de Oil Red O ($n = 5$). (E) Aumento do acúmulo de gotículas lipídicas foi observado no ovário dos ratos TBT ($n = 5$). (B, B1) Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) demonstrando o aspecto normal do ovário CON e (D, D1) acumulação anormal de gotículas lipídicas no estroma ovariano TBT ($n = 4$). (F) Foram observados níveis elevados de colesterol no ovário dos ratos TBT ($n = 5$). ** $p < 0.01$ vs. CON (teste t de *Student*). A, C (Barra = $200 \mu\text{m}$). B, D (Barra = $5 \mu\text{m}$). B1, D1 (Barra = $2 \mu\text{m}$).....48

Figura 6: Morfologia uterina nas fêmeas ($n = 5$). As seções representativas dos (A, A1, A2, A3) CON e (B, B1, B2, B3) TBT útero foram coradas com H & E, foi indicado atrofia, células apoptóticas em LE (seta, B2) e presença de células inflamatórias (asterisco, B2 e B3) no TBT. (A, A1, A2, A3) Os aspectos regulares do endométrio, miométrio e LE e GE foram observados no CON. (C) Área endometrial e (D) miometrial reduzida nos ratos TBT. *** $p < 0.001$ vs. CON (teste t de *Student*). L: lúmen. LE: epitélio luminal. GE: epitélio glandular. End: endométrio. Myo: miométrio. Barra = $100 \mu\text{m}$ (A, A1, B, B1). Barra = $50 \mu\text{m}$ (A2, A3, B2, B3).....50

Figura 7: (A) Inflamação no ovário e útero das fêmeas ($n = 5$). As seções representativas de mastócitos (seta) nos ovários TBT (A) CON e (C) foram coradas com *Alcian Blue*. (E) Não foi observada diferença significativa nos mastócitos nos ovários dos ratos CON e TBT. Seções de representativas de mastócitos de (B) CON e (D) TBT no útero. (F) Aumento dos mastócitos no útero dos ratos TBT. (G) Aumento da atividade MPO no ovário dos ratos TBT. (H) atividade de MPO no útero dos ratos TBT. (I) atividade NAG no ovário dos ratos CON e TBT. (J) Aumento da atividade NAG no útero dos ratos TBT. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. CON (teste t de *Student*). NAG: N-Acetil-p-D-Glucosaminidase. MOP: Myeloperoxidase. Barra: $12,5 \mu\text{m}$ (A-D).....52

Figura 8: Detecção *in situ* da produção de ânions superóxido (O_2^-) e atividade GSH no ovário e útero dos ratos CON e TBT (n = 5). As micrografias fluorescentes da coloração com o corante sensível a O_2^- (fluorescência vermelha) foram obtidas a partir dos ovários (A) CON e (C) TBT, e dos úteros (B) CON e (D) TBT. (E) Aumento da produção de O_2^- observado nos ovários TBT. (F) A produção de O_2^- foi observada no útero de CON e TBT. (G e H) atividade de GSH nos ovários e úteros dos ratos CON e TBT. **p<0.01 vs. CON (teste t de *Student*). F: folículo ovariano. L: lúmen uterino. Barra: 60 μ m.....54

Figura 9: Depósito de colágeno no ovário e útero das fêmeas. Seções representativas de colágeno nos ovários (A, A1) CON e (C, C1) TBT, e nos úteros (B, B1) CON e (D, D1) TBT corados com *Picro-sirius Red* (n = 5). (E, F) Aumento da deposição de colágeno nos ovários e úteros TBT. * p<0.05 vs. CON (teste t de *Student*). Barra = 100 μ m (A-D). Barra = 50 μ m (A1, B1, C1 e D1). L: lúmen uterino. End: endométrio. Myo: miométrio.....56

Figura 10: A correlação entre os marcadores adipogênicos ovarianos, esteroidogênese, inflamação do trato reprodutivo e estresse oxidativo. Os valores da expressão de CYP11A1 foram traçados em conjunto com (A) os níveis de colesterol no ovário, (B) expressão de PPAR γ , (C) expressão de C/EBP- β e (D) expressão de Lipin-1. A expressão da aromatase foi correlacionada com (E) níveis de colesterol no ovário, (F) expressão de PPAR γ , (G) expressão de C/EBP- β e (H) expressão de Lipina-1. Os valores para a inflamação do ovário foram correlacionados com (I) os níveis de colesterol de ovário, (J) expressão de PPAR γ , (K) expressão de C EBP- β e (L) expressão de Lipina-1. Os dados do estresse oxidativo do ovário foram plotados com (M) os níveis de colesterol do ovário, (N) expressão de PPAR γ , (O) expressão de C/EBP- β e (P) expressão de Lipina-1. A inflamação uterina foi analisada e correlacionada com alguns parâmetros dos ovários. Por esta razão, os valores para a inflamação uterina foram traçados com (Q) os níveis de colesterol no ovário, (R) expressão de PPAR γ , (S) expressão C/EBP- β e (T) expressão de Lipin-1. O significado estatístico (p<0,05) foi testado usando o teste de Spearman ou Pearson se fosse detectada uma distribuição de dados não gaussiana ou gaussiana, respectivamente..58

Figura 11: Um modelo do potencial mecanismo de modulação obesogênica no trato reprodutivo feminino adulto. O TBT leva a irregularidades do trato reprodutivo (linha vermelha), tais como: (1) redução da expressão de mRNA da aromatase e comprometimento na esteroidogênese ovariana, (2) esteroidogênese anormal possivelmente associada a comprometimento do desenvolvimento folicular ovariano e formação de corpo lúteo (CL), (3) adipogênese ovariana anormal devido à aumento de genes adipogênicos, (4) adipogênese ovariana anormal possivelmente associada a esteroidogênese irregular, (5) inflamação do trato reprodutivo e estresse oxidativo, (6) apoptose e deposição de colágeno no trato reprodutivo e (7) adipogênese anormal direta e / ou irregularidades indiretas do trato reprodutivo.....61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: *Primers* usados para a análise da expressão de genes por RT-qPCR.....34

Tabela 2: Avaliação do peso corporal e tecidos.....38

LISTA DE ABREVIATURAS

AROM	Aromatase
C/EBP β	Proteína potencializadora de ligação/CCAAT β
CL	Corpo lúteo
CON	Controle
CYP11A1	Colesterol desmolase
D	Diestro
DHE	Dihidroetidio
D-P	Diestro-Proestro
E	Estro
E ₂	Estradiol
EDCs	Desreguladores endócrinos
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
EPM	Erro padrão da média
ER- α	Receptor de estrogênio alfa
ER- β	Receptor de estrogênio beta
FI	Fatores de incerteza
FSH	Hormônio folículo-estimulante
GPGR	Receptor de estrogênio acoplado a proteína G
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
GSH	Glutathione Redutase
HPG	Hipotálamo-hipófise-gônadas
KGC line	Linhagem de células tumorais, como da granulosa humana
LH	Hormônio luteinizante
LOAEL	Nível do Menor Efeito Observado
M1	Metaestro 1
M2	Metaestro 2
M-D	Metaestro-Diestro
MPO	Mieloperoxidase
NAG	N-acetil-b-D-glicosaminidase
NOAEL	Nível de Efeito Adverso Não Observado
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
OTs	Organoestânicos

P	Proestro
PBS	Tampão fosfato-salina
P-E	Proestro-Estro
PPAR γ	Receptor ativado por proliferador de peroxissoma γ
PVC	Cloreto de polivinila
RNA	Ácido ribonucleico
RP-A	Receptor de progesterona A
RP-B	Receptor de progesterona B
RXR	Receptor retinóide X
Sn	Estanho
StaR	Proteína reguladora aguda esteroidogênica
TBT	Tributilestanho
TBTCl	Cloreto de tributilestanho
TBTO	Óxido de tributilestanho
TBTOH	Hidróxido de tributilestanho
TPT	Trifenilestanho

RESUMO

O Tributilestanho (TBT) é um obesogênico associado a várias disfunções metabólicas e reprodutivas, depois da exposição *in útero*. No entanto, poucos estudos avaliaram o efeito obesogênico do TBT em ovários adultos. Nesse trabalho, avaliamos os efeitos desse poluente no trato reprodutivo de ratas adultas, bem como seu efeito obesogênico nesses órgãos. Para isso, o TBT foi administrado, por 30 dias, em ratas Wistar com 12 semanas de idade e com ciclo estral normal. Durante o tratamento, esse ciclo foi acompanhado e observamos alterações nas fases e comprimento. Avaliamos, também, os parâmetros biométricos e a morfofisiologia do sistema reprodutivo, com foco em ovário e útero. Foram feitas dosagens dos hormônios sexuais (LH, FSH, progesterona, estrogênio e testosterona), constatando que seus níveis estavam alterados. Além disso, foi observado que a via esteroidogênica estava alterada nos animais tratados. Avaliamos ainda a expressão de proteínas e de mRNA de fatores que regulam a adipogênese. Esses animais demonstraram adipogênese ovariana anormal com níveis aumentados de colesterol, aumento no acúmulo de lipídeos e aumento na expressão de PPAR γ , C/EBP- β e Lipina-1. Observou-se uma correlação negativa entre a expressão de PPAR γ do ovário e a expressão da aromatase nas ratas TBT. Além disso, a exposição ao TBT resultou em atrofia, inflamação, estresse oxidativo e fibrose no trato reprodutivo. As disfunções do ovário também ocorreram juntamente com as irregularidades uterinas e os marcadores adipogênicos anormais do ovário dos animais TBT podem estar associados a essas irregularidades uterinas, visto que foi observada uma correlação positiva entre os níveis de colesterol no ovário e a inflamação uterina nesses animais. Esses achados sugerem que TBT leva a efeitos obesogênicos ovarianos diretamente por adipogênese anormal e/ou indiretamente por meio de irregularidades no trato reprodutivo.

Palavras-chave: Contaminação Ambiental. Tributilestanho. Toxicidade. Desregulação Endócrina. Ciclo Reprodutivo. Prejuízo Reprodutivo.

ABSTRACT

Tributyltin (TBT) is an obesogen associated with various metabolic and reproductive dysfunctions after *in utero* exposure. However, few studies have evaluated the obesogenic effect of TBT on adult ovaries. In this work, we evaluated the effects of this pollutant on the reproductive tract of adult female rats, as well as the obesogenic effect on these organs. For this, TBT was administered for 30 days in Wistar female rats at 12 weeks of age and with normal estrous cycle. During treatment, this cycle was followed, and we observed changes in phases and length. We also evaluated the biometric parameters and the morphology of the reproductive system, focusing on ovary and uterus. Were made dosages of sex hormones (LH, FSH, progesterone, estrogen and testosterone), noting that their levels were altered. In addition, it was observed that the steroidogenic pathway was altered in treated animals. We also evaluated the expression of proteins and mRNA of factors that regulate adipogenesis. These animals demonstrated abnormal ovarian adipogenesis with increased cholesterol levels, increased lipid accumulation and increased expression of PPAR γ , C/EBP- β and Lipin-1. A negative correlation was observed between ovarian PPAR γ expression and aromatase expression in TBT rats. In addition, exposure to TBT resulted in atrophy, inflammation, oxidative stress and fibrosis in the reproductive tract. Ovarian dysfunctions also occurred along with uterine irregularities and abnormal adipogenic ovary markers of TBT animals, may be associated with these uterine irregularities, as a positive correlation was observed between ovary cholesterol levels and uterine inflammation in TBT rats. These findings suggest that TBT leads to ovarian obesogenic effects directly by abnormal adipogenesis and/or indirectly through irregularities in the reproductive tract.

Keywords: Environmental Contamination. Tributyltin. Toxicity. Endocrine disruption. Reproductive cycle. Reproductive injury.

1 - Introdução

Os crescentes prejuízos em decorrência do aumento da poluição no planeta têm levado a um estado de alerta constante em grande parte da população mundial. Em razão do desenvolvimento de doenças relacionadas à exposição aos poluentes, tornou-se evidente a necessidade de se adotar alternativas ao estilo de vida moderno, buscando reduzir os danos ao nosso planeta e, conseqüentemente a nós mesmos. Além da preocupação com o aumento da destruição do ambiente terrestre, nos últimos anos, os oceanos tem sido foco dos debates sobre preservação, conservação e manejo. Ao avaliar o ambiente marinho, a maioria dos poluentes que entram neste ecossistema é prejudicial à biota como um todo, trazem riscos à saúde humana e comprometem as atividades marinhas, incluindo a pesca, além de prejudicar a qualidade da água. Esses efeitos estão associados a substâncias tóxicas, fármacos, poluição térmica, patógenos, resíduos sólidos, particulados em suspensão, nutrientes e qualquer tipo de influência xenobiótica ao meio aquático, normalmente de origem antrópica (Patin, 1982). Um exemplo de poluidor antrópico seria o uso de tintas anti-incrustantes em cascos de navios, cujo princípios ativos são compostos organoestânicos (OTs), como o Tributilestanho (TBT) ou o Trifenilestanho (TPT) (Godoi, 2003).

O primeiro estudo sobre OTs foi realizado por Sir Edward Frankland (1825-1899) entre 1853 a 1859. Por muitas décadas esses compostos despertaram apenas interesse científico, pois não revelavam nenhum potencial comercial (Blunden e Evans, 1990). Em 1925, foi feita a primeira aplicação prática com OTs, chamados de “agentes anti-traças”, porém nunca chegaram a ser usados com essa finalidade (Luijten, 1987). Por volta de 1940, começaram a ser utilizados na indústria do plástico, principalmente como estabilizantes na produção do cloreto de polivinila (PVC) (Blunden & Evans, 1990). Seu uso como biocida surgiu por volta de 1950, demonstrando ação sobre fungos, bactérias, organismos marinhos, vermes parasitas, caramujos aquáticos e insetos (Luijten, 1987). No final de 1960, alguns OTs começaram a ser utilizados como pesticidas, na preservação de madeira e em tintas anti-incrustantes (Blunden e Evans, 1990).

No ambiente marinho, o TBT está presente principalmente na forma Hidróxido de Tributilestanho (TBTOH), tendo sua disponibilidade aumentada quando o pH > 8 (Fent, 1996; Alzieu, 1998;). Nesses ambientes, os triorganoestânicos podem ser facilmente adsorvidos ao material particulado em suspensão e na superfície dos

sedimentos marinhos (Langston & Pope, 1995; Hoch, 2001). Aproximadamente 95 % do TBT presente na coluna d'água está adsorvido ao material particulado em suspensão, incluindo o plâncton (Gadd, 2000).

Por sua notável ação biocida, o TBT se tornou o principal composto no mundo utilizado em tintas anti-incrustantes. Acreditava-se ser o biocida ideal por possuir fácil degradação, podendo ocorrer pela ação de ácidos, microalgas e radiação solar na coluna d'água (Gadd, 2000; Hoch, 2001). No entanto, na década de 70, a França anunciou o primeiro relato de ação nociva do TBT em organismos não-alvos, que lhe conferiu o caráter de poluente/tóxico ambiental (Alzieu, 1998). A partir de então, muitos estudos passaram a ser realizados na tentativa de demonstrar a alta toxicidade desse composto. Na década de 90, cerca de 80% das embarcações de grande porte utilizavam tintas anti-incrustantes a base de OTs em seus cascos (IMO, 1999). No Brasil, em 1992, foi adotado o “Princípio da Precaução”, que estabelecia a proibição total do uso de TBT a partir de 1º de janeiro de 2003.

OTs, como o TBT, são poluentes organometálicos persistentes, com características de desreguladores endócrinos (*Endocrine Disrupting Chemicals - EDCs*), ou seja, uma substância que causa uma modulação inapropriada do sistema endócrino por causa de dieta ou contaminantes ambientais (Colborn *et al.*, 1993). São compostos exógenos com potencial para alterar a modulação hormonal (direta ou indiretamente) do sistema endócrino como um todo, podendo afetar a função reprodutiva e/ou metabólica de mamíferos. Esses compostos podem promover uma alteração na produção, liberação, mecanismos de ação, metabolismo, eliminação, e podem mimetizar a ação de hormônios naturais (Tabb & Blumberg, 2006). Os EDCs podem ser derivados de compostos de origem animal, humana, vegetal ou sintéticos. Entretanto, a maior parte da preocupação está relacionada à toxicidade desses produtos químicos sintéticos, tanto os de ação pouco esclarecida, quanto os com potencial de desregulação endócrina já conhecido (Casals-casas & Desvergne, 2011). Os principais produtos químicos industriais considerados EDCs e suas classes foram recentemente revisados e as estimativas atuais identificaram aproximadamente 1000 produtos químicos que atendem aos critérios (Gore 2016).

Investigações toxicológicas demonstraram que os OTs possuem ações cito, neuro e genotóxicas em diferentes modelos animais de invertebrados e vertebrados. Essas ações são capazes de afetar alguns animais em seu *habitat* natural, causando alterações morfofuncionais macroscópicas, modificando seu comportamento ecológico,

chegando a reduzir sua capacidade de adaptação ao meio (Kovalchuck *et al.*, 1998). Por essa razão, esses organismos são considerados bioindicadores ambientais da contaminação/poluição pelos OTs, como ocorre em gastrópodes sensíveis ao TBT (Ohhira *et al.*, 2003; Delgado Filho *et al.*, 2010).

Dentre os efeitos tóxicos causados pelo TBT, um dos mais notáveis foi o desenvolvimento sexual anormal, devido à desregulação endócrina, em algumas espécies de gastrópodes (Matthiessen *et al.*, 1995). Esse fenômeno, conhecido como “*imposex*” ou “Pseudohermafroditismo”, é caracterizado por uma superposição de órgãos genitais masculinos em fêmeas. Tal masculinização ocorre pelo desenvolvimento de pseudo-pênis e canal deferente em fêmeas afetadas (Shi *et al.*, 2005). Fent (1996) relacionou o grau de desenvolvimento do pênis e a frequência de *imposex* em fêmeas de caramujo aos níveis de TBT, sendo esses efeitos mais intensos em áreas próximas a portos e marinas.

Desreguladores endócrinos podem atuar diretamente sobre uma glândula endócrina, alterando sua função, ou agir diretamente sobre a expressão de um receptor hormonal e alterar a função de determinado hormônio em seu órgão-alvo (Brown *et al.*, 2001). A exposição aos OTs induz modificações morfológicas, como perda de peso em órgãos reprodutivos (Omura *et al.*, 2001; Ogata *et al.*, 2001; Grote *et al.*, 2004), e interferência na função de hormônios sexuais (Omura *et al.*, 2001; Grote *et al.*, 2004; Grote *et al.*, 2006; Kishta *et al.*, 2007) em ambos os gêneros de roedores. Trabalhos vêm demonstrando que o TBT altera funções em glândulas de mamíferos, como o pâncreas, hipófise, gônadas (masculina e feminina) e tireóide (Wada *et al.*, 1982; Oberdörster *et al.*, 1998; Vos *et al.*, 2000; Podratz *et al.*, 2012; Bertuloso *et al.*, 2015).

Além disso, Pereira-Fernandes *et al.* (2013), descreveram o TBT como um composto obesogênico, ou seja, um químico com capacidade de influenciar a obesidade, desvendando mecanismos envolvidos no estímulo de células 3T3-L1 por esse poluente. Outros trabalhos vêm demonstrando que o TBT é capaz de interferir no metabolismo lipídico, bem como em sua deposição em diferentes tecidos em vários grupos de animais, tais como peixes e mamíferos, induzindo assim a diferenciação e proliferação de adipócitos (Grun *et al.*, 2006; Chamorro-García *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013; Jordao *et al.*, 2015; Lyssimachou *et al.*, 2015). Os obesogênicos, uma subclasse EDC, podem interromper processos metabólicos sensíveis se a exposição que ocorre durante o desenvolvimento embrionário. Esses compostos já foram identificados e sabe-se que atuam como programadores metabólicos que aumentam o

risco de obesidade (Grün e Blumberg 2009; Heindel, 2003). Os produtos químicos obesogênicos predisõem os indivíduos ao ganho de peso devido a mudanças nos "set-points" metabólicos, como os organoestênicos (OT), particularmente se a exposição ocorrer durante períodos sensíveis do início da vida uterina (Grün *et al.*, 2006; Heindel *et al.*, 2015).

A bioacumulação dos OTs ao longo de cadeias alimentares está relacionada a diferentes prejuízos funcionais em mamíferos, como modificações metabólicas *in vivo* e *in vitro* (Grün; Blumberg, 2006; Graceli *et al.*, 2013) e desenvolvimento de fatores de riscos cardiovasculares (Santos *et al.*, 2012). A exposição humana aos desreguladores endócrinos pode ocorrer pela transferência ao longo de cadeias alimentares, com a ingestão de dieta contaminada (Kannan *et al.*, 1995; Chien *et al.*, 2002; Bila and Dezotti, 2007), e também por meio da água contaminada (Lo *et al.*, 2003). Sousa *et al.* (2017) ao analisar as refeições consumidas por diferentes pessoas de uma universidade em Portugal durante 7 dias, demonstraram presença de diferentes tipos de OTs, dentre eles o TBT e seus metabólitos, em alimentos de origens diversas, como carne, camarão, tofu, entre outras, demonstrando que mesmo após seu banimento, o TBT continua ativo em diferentes partes de cadeias alimentares.

Segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US-EPA, 1997), a dose considerada segura ou aceitável para humanos em exposição ao TBT é de 250 ng/Kg por dia. Essa dose foi arredondada para 300 ng/Kg por dia pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1990). Para se chegar a essa dose é feita a caracterização do risco, avaliando a toxicidade do composto e a relacionando com a exposição à qual o indivíduo é submetido. Dessa forma, estudos de dose-resposta são comumente realizados para se conhecer os parâmetros NOAEL (Nível de Efeito Adverso Não Observado) e LOAEL (Nível do Menor Efeito Observado) de cada composto químico, ou seja, as doses de referências máxima e mínima, respectivamente, que podem ser administradas sem que haja efeitos adversos no indivíduo exposto ao contaminante. São utilizados, ainda, fatores de incerteza (FI), que são uma extrapolação de dados animais para humanos feita durante a avaliação do risco, fornecendo uma margem de segurança adicional (USEPA, 1997).

Trabalhos do nosso grupo demonstraram que o TBT leva ao comprometimento do desenvolvimento folicular ovariano, níveis reduzidos de estradiol (E₂) e no número de Corpo Lúteo (CL), aumento da apoptose e fibrose ovariana (Podratz *et al.*, 2012; Sena *et al.*, 2017). No entanto, o mecanismo tóxico não é totalmente compreendido.

Sabe-se que o TBT promove adipogênese e lipogênese, além de perturbar os principais reguladores das vias metabólicas em modelos *in vivo* e *in vitro*, alterando a ativação de Receptor retinóide X (RXR) e Receptor ativado por proliferador do peroxissoma γ (PPAR γ) (Grün *et al.*, 2006, Penza *et al.*, 2011). A exposição *in útero* ao TBT leva a uma acumulação lipídica surpreendentemente elevada no tecido adiposo mamário, no fígado e nos testículos de roedores neonatos (Grün *et al.*, 2006). Kirchner *et al.* (2010) relataram que a exposição perinatal e *in vitro* ao TBT altera o compartimento das células estaminais multipotentes, ao sensibiliza-las no estroma para se diferenciar em adipócitos. Esse efeito provavelmente poderia aumentar a massa adiposa ao longo do tempo, alterando os principais fatores de transcrição.

É bem estabelecido que a reprodução é um processo de fundamental importância para a perpetuação das espécies. Nos mamíferos, os gametas masculinos e femininos são produzidos pelos testículos e pelos ovários, respectivamente. Esse processo exige harmonia entre hipotálamo, hipófise e gônadas. Essa harmonia é orquestrada pelo cérebro, mais especificamente dos neurônios hipotalâmicos que produzem o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). Esse hormônio, ao chegar à adeno-hipófise, estimula a produção/liberação de gonadotrofinas, hormônio luteinizante (LH) e folículo-estimulante (FSH). Nas mulheres, esses hormônios vão estimular o crescimento dos folículos ovarianos, a produção do estrogênio, progesterona e inibina. O LH estimula as células da teca interna de folículos maduros a produzirem andrógenos que serão transformados em estrogênio, nas células da granulosa pela aromatase, enzima da família do citocromo P₄₅₀ responsável por essa conversão, sob estímulo do FSH. Esse estrogênio, juntamente com o FSH, irá estimular a proliferação celular da granulosa dentro do folículo ovariano, e das demais alterações nas fases uterinas. Além disso, o LH induz a ovulação e iniciam a formação do corpo lúteo (Folicori *et al.*, 1986; Magiakou *et al.*, 1997; Hill, Wise, Anderson, 2012, p. 471).

Sabe-se que os hormônios sexuais são produzidos a partir do colesterol, que pode ser obtido por de fontes alimentares e/ou formado no fígado. O colesterol também pode ser produzido por diferentes células ovarianas com as enzimas necessárias. Esse colesterol é transportado para dentro da mitocôndria pela proteína StaR, uma proteína reguladora da esteredoigênese. Na mitocôndria, o colesterol é convertido em pregnenolona pela enzima P₄₅₀SSC (20, 22 – desmolase ou Colesterol-desmolase), essas duas etapas ocorrem nas células da teca e são dependentes do LH durante a toda fase folicular, nas células da granulosa no final da fase folicular e nas células do

corpo lúteo. Na teca interna, a pregnenolona será transformada em progesterona e em seguida androstenediona, principal androgênio produzido pelo ovário. A androstenediona dará origem a testosterona que, sob a ação da aromatase, será convertida em estrona ou estradiol (Franci, C.R.; Anselmo-Franci, J., A., 2008, p. 1062). Estudos bioquímicos demonstraram que o TBT inibe competitivamente a aromatase (Matthiessen e Gibbs, 1998; Saitoh *et al.*, 2001), aumentando assim os níveis de hormônios sexuais masculinos e, conseqüentemente, prejudicando o desenvolvimento sexual de ratos (Grote *et al.*, 2004).

Além da via esteroideogênica, outras também são afetadas pelo TBT, podendo alterar o equilíbrio dinâmico dos níveis hormonais e aumentar os níveis séricos de progesterona. Dessa forma, pode-se ter como resposta a diminuição do peso uterino, da taxa de gravidez e do número de implantes de fetos em fêmeas pseudogravídas (Ema; Miyawaki, 2002).

O eixo hipotálamo-hipófise-ovário (HPO), regula entre outros, o ciclo sexual mensal, que se divide em ciclo ovariano e ciclo uterino. O ciclo ovariano pode ser dividido em fase folicular, ovulatória e lútea. A fase folicular tem início logo após a fase lútea tardia do ciclo reprodutivo anterior, ocorrendo o início do crescimento folicular e aumento dos níveis séricos de FSH. Os níveis de LH sobem um ou dois dias depois, momento em que o ovário começa a secretar estradiol. Entre o sétimo e o oitavo dia anterior ao pico pré-ovulatório, a secreção do estradiol aumenta. Essa elevação nos níveis de estradiol é acompanhada pela redução do FSH. Paralelamente, ocorre uma pequena elevação nos níveis séricos de progesterona, seguido pelo pico de LH ovulatório, último estágio de maturação do folículo de Graaf, que se romperá entre a 16ª e 24ª hora seguinte (Magiakou *et al.*, 1997).

Na fase lútea, as células foliculares se encontram lutenizadas. Essas células tornam-se hipertrofiadas, com capacidade de síntese hormonal aumentada, aumento de grânulos lipídicos, aumento do volume nuclear e do retículo endoplasmático liso. Dessa forma, o folículo pós-ovulatório se torna cada vez mais vascularizado. O LH é responsável pela sobrevivência e manutenção do CL. Nesse momento ocorre o aumento acentuado da progesterona secretada pelo CL. Ocorre também aumento no nível de estrogênio, aumento menor quando comparado com o da progesterona. Esse aumento da progesterona causa o declínio de LH e FSH durante grande parte da fase lútea. No entanto, o FSH começa a se elevar para iniciar o crescimento folicular do ciclo seguinte (Yen, 1978; Filicori *et al.*, 1986; Magiakou *et al.*, 1997).

Uma das funções dos esteroides ovarianos é preparar o sistema reprodutor feminino para a gestação. Portanto, além de atuar no ciclo ovariano, esses hormônios também vão agir no ciclo uterino. Esse ciclo é dividido em 3 fases: proliferativa, secretora e menstruação, que se relacionam com o ciclo ovariano devido aos níveis hormonais. No início da fase folicular ovariana, o aumento nos níveis de estrogênio estimula o aumento da musculatura uterina e a proliferação celular do estroma e da camada epitelial do endométrio, além do desenvolvimento das glândulas endometriais e novos vasos sanguíneos. As glândulas epiteliais secretam um muco fino e o útero passa a reter água e eletrólitos, tornando-se edemaciado. Ao longo da fase folicular, o endométrio se torna cada vez mais edemaciado e espesso. O estrogênio, ainda, aumenta a contratilidade do miométrio, além de induzir a expressão de receptores de progesterona. Na fase secretora, ocorre a liberação de grandes quantidades de estrogênio e progesterona após a ovulação, os estrogênios vão estimular mais crescimento endometrial, enquanto que a progesterona leva ao funcionamento das glândulas endometriais e desenvolvimento das artérias uterinas. Se não ocorre a fertilização, o endométrio atrofia, bem como as glândulas endometriais e artérias espiraladas, levando a isquemia funcional da camada e, conseqüentemente, a menstruação (Franci, C.R.; Anselmo-Franci, J., A., 2008, p. 1070; Hill, Wise, Anderson, 2012, p. 470).

Em roedores, como ratas, o ciclo estral ou ciclo reprodutivo regular tem duração média de quatro ou cinco dias (Freeman, 1988; Bianchi *et al.*, 2001) e é caracterizado por quatro fases: proestro, estro, metaestro e diestro (Freeman, 1988). No ciclo desses animais, os níveis de LH e FSH se elevam no início da fase folicular, o proestro, que se caracterizam por ser uma fase curta, geralmente dura um dia, e pela predominância de células epiteliais nucleadas presentes na região mais externa vagina das ratas (Schwartz, 1964; Nelson *et al.*, 1982). A fase seguinte, estro, corresponde à fase ovulatória, com progesterona no nível máximo, e se caracteriza pela presença predominante de células epiteliais cornificadas. Essa fase pode ter duração de um a dois dias, dependendo do ciclo ser de quatro ou cinco dias, respectivamente. No metaestro, inicia-se o aumento no nível de estradiol que atingirá seu nível máximo no proestro do ciclo seguinte. Durante essa fase, a secreção de progesterona também se eleva, e volta a se reduzir após o diestro. A fase de metaestro é uma fase de transição de ciclos, não havendo ação máxima de apenas um hormônio. Dessa forma, é possível observar a presença de leucócitos, células nucleadas e cornificadas no esfregaço

vaginal. No diestro, observa-se uma grande quantidade de leucócitos, visto que não há descamação na parede da vagina (Schwartz, 1964; Nelson *et al.*, 1982, Podratz *et al.*, 2015).

O controle do ciclo reprodutivo ocorre pela ação de esteroides sexuais, principalmente pelo estrogênio e pela progesterona. A regulação pelo estrogênio é feita via genômica pelos receptores hormonais nucleares específicos, como os receptores de estrogênio α (ER- α) e β (ER- β), considerados receptores clássicos, e não-genômica, por meio da ligação ao receptor descoberto mais recentemente Receptor de estrogênio acoplado a proteína G (GPER) (Kuiper *et al.*, 1996; Gustafsson, 2003; Revankar *et al.*, 2005). Já a progesterona tem ação modulada pelos receptores de progesterona A (RP-A) e B (RP-B) (Lemale *et al.*, 2008). Sabe-se que os receptores acoplados a proteína G, como o GPER, representam uma grande classe de moléculas sinalizadoras. Esses receptores são proteínas expressas na superfície celular, com 7 domínios transmembranares. Ao se ligarem a agonistas, ocorre a ativação da proteína G, um heterodímero ligado à guanina, seguida de uma cascata de reação de proteínas reguladoras e efetoras. Esse receptor também se encontra na membrana do retículo endoplasmático e no complexo de Golgi, sendo assim, o estrogênio seria capaz de se ligar à essa proteína, intracelular (Filardo *et al.*, 2002; Prossnitz, 2004; Ravankar *et al.*, 2005). Porém, quando receptores do tipo nucleares se ligam aos hormônios específicos, sofrem rearranjos conformacionais, levando a formação de homô ou heterodímeros de ER- α , ER- β , RP-A e RP-B. Quando em atividade, interagem diretamente com alta afinidade com regiões específicas do material genético da célula, chamados elementos responsivos do estrogênio ou da progesterona (Lemale *et al.*, 2008), levando a um estímulo positivo e/ou negativo na expressão gênica de sua célula-alvo.

Embora existam muitas investigações demonstrando os efeitos tóxicos dos OTs em diferentes partes do sistema reprodutivo, pouco se sabe sobre seu efeito obesogênico em ovários de ratas adultas, bem como os efeitos do estresse oxidativo e inflamação no ovário e úteros desses animais.

2 – OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral

Avaliar o efeito obesogênico, bem como as possíveis alterações no ciclo reprodutivo de ratas adultas com exposição ao TBT, para melhor compreender seus efeitos sobre o trato reprodutor feminino.

2.2- Objetivos Específicos

- Verificar o efeito da exposição, a baixas doses de TBT, por 30 dias sobre a ciclagem regular, duração das fases e do ciclo reprodutivo;
- Analisar dos parâmetros biométricos;
- Analisar a histomorfometria ovariana e uterina;
- Analisar as concentrações séricas basais dos hormônios sexuais;
- Analisar a estereidogênese dos hormônios ovarianos;
- Analisar possíveis processos inflamatórios no ovário e útero;
- Analisar estresse oxidativo no ovário e útero;
- Analisar a adipogênese anormal no ovário.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Modelo experimental

Foram utilizadas ratas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) pesando aproximadamente 230 g, com 3 meses de idade, fornecidas pelo biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (43x30x15 cm), não ultrapassando o número de 5 animais por gaiola, em ambiente com temperatura (20-24 °C) e umidade controladas (40-60%), iluminação artificial de acordo com o recomendado para biotérios de pesquisas (FINEP), 12 horas de claro/escuro. As ratas tiveram livre acesso à água e comida durante todo o experimento. Os protocolos experimentais desenvolvidos durante esse projeto foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFES (CEUA), com o registro 106/2011.

3.1a - Grupos experimentais

Os animais foram divididos, aleatoriamente, em: Grupo Controle (CON) (n=38) e Grupo TBT (n=38). Os animais do Grupo Controle foram submetidos à gavagem com veículo (solução etanólica 0.4%) durante 30 dias com veículo. O Grupo TBT (n=38) foi tratado por 30 dias com tributilestanho e recebeu uma dose de 100 ng/Kg de peso corporal/dia de tratamento do TBT (Sigma, St. Louis, Mo., USA) diluído em solução de etanol 0,4%, via gavagem. Estes grupos de animais receberam água e ração *ad libitum* até o dia da eutanásia.

Segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 1997) e a Organização Mundial de Saúde (WHO, 1990), a dose considerada segura ou aceitável para humanos em exposição ao TBT é de 300 ng/Kg por dia. Para se chegar a essa dose é feita a caracterização do risco, avaliando a toxicidade do composto em relação à exposição à qual o indivíduo está submetido. A dose selecionada para o tratamento dos animais no presente trabalho foi de 100 ng/Kg/dia, 3x menor do que a considerada segura para a ingestão diária. Essa seleção permite avaliar os possíveis efeitos tóxicos do TBT, mesmo sob exposição aparentemente segura.

3.2 – Avaliação do Ciclo Estral das Ratas

Para avaliar o ciclo reprodutivo (estral), a secreção vaginal dos animais foi coletada diariamente entre 8:00 e 9:00 horas da manhã, sendo obtida após injeção intravaginal de 10µL de solução salina (NaCl 0,9 %). Todas as ratas apresentavam ciclo estral regular, de quatro a cinco dias, sendo que o ciclo reprodutivo foi monitorado por análise do esfregaço vaginal recolhido diariamente durante duas semanas consecutivas antes de iniciar os experimentos (Lisboa *et al.*, 2001; Podratz *et al.*, 2012). Este material foi depositado sobre lâminas, previamente limpas e secas, cada lâmina recebendo o esfregaço vaginal de 3 animais diferentes, de forma ordenada e sem contato entre eles. Posteriormente, essas lâminas foram fixadas em metanol e coradas com hematoxilina e eosina. Depois de secas, as lâminas foram analisadas em microscópio óptico (Nikon Eclipse E200) para avaliação de cada fase do ciclo. As fases do ciclo foram determinadas por citologia e pela consistência do muco vaginal: foi observado muco pouco espesso com predominância de leucócitos, poucas células epiteliais nucleadas bem formadas, e muito pouca ou nenhuma célula cornificada, classificamos como transição de diestro-proestro (DP); muco com consistência média, predominância de células nucleadas, de nenhum a muito pouco leucócitos degenerando e muito pouca a nenhuma célula cornificada, classificamos como proestro (P); se não observamos leucócitos, presença de células nucleadas, predominância de células cornificadas e muco de consistência média, classificamos como transição proestro-estro (PE); muco com consistência média a muito denso e presença apenas de células cornificadas, classificamos o ciclo como estro (E); se o esfregaço apresentar de nenhum a pouco leucócito e predominância de células cornificadas maiores do que em estro, além de muco com densidade média a muito espessa, classificamos a fase como metaestro 1 (M1); na predominância de leucócitos, poucas células nucleadas e irregulares, poucas células cornificadas e muco com espessura de média para muito espesso, classificamos como metaestro 2 (M2); quando observamos predominância de leucócitos e pouquíssimas células nucleadas, muitas vezes irregulares, com muco pouco espesso, classificamos como diestro (D) (Nelson *et al.*, 1982). A frequência total de cada fase observada neste período, para cada animal, foi utilizada para a duração das fases de proestro, estro e metaestro-diestro (em dias), bem como a duração total do ciclo estral. Determinamos a fase metaestro-diestro (M-D) devido às incertezas para

classificar M1, M2 e D com precisão, Todas as quantificações foram realizadas por um único observador (Marcondes *et al.*, 2002; Podratz *et al.*, 2015).

3.3 – Avaliação dos pesos dos Órgãos

Após a exposição ao TBT por 30 dias, os animais foram eutanasiados. De cada rata, foram retirados: coração, pulmão, baço, timo, pâncreas, rins, adrenais, fígado, ovários, útero, gordura parametrial, gordura perirrenal, gordura retroabdominal e gordura retroperitoneal. Esses órgãos foram pesados em balança de alta precisão. Além disso, foram colocados em estufa a 100 °C por 24 horas para avaliação do peso seco. Todo procedimento de pesagem foi realizado pela mesma pessoa.

3.4 – Avaliação dos Níveis Séricos Hormonais

Após a decapitação, as amostras de sangue foram recolhidas e imediatamente centrifugadas a 3800 rpm (2324 g), a 4 °C durante 15 minutos para se obter o soro, que foi acondicionado a -20°C para posterior medição dos níveis de estradiol e progesterona por ELISA (Moysés *et al.*, 2001; Podratz *et al.*, 2012). A técnica de ELISA foi utilizada para dosar LH (Kit DS-EIA-GONADOTROPIN-LH, Diagnostic Systems Ltd.), FSH (DS-EIA-GONADOTROPIN-FSH, Diagnostic Systems Ltd.), Estrogênio (Estrogen-2693 EIA, Diagnostic Systems Laboratories, Saronno, Italy), Progesterona (Progesterone-1561 EIA, Diagnostic Systems Laboratories, Saronno, Italy) e Testosterona (Testosterone-1559, EIA, Diagnostic Systems Laboratories, Saronno, Italy).

3.5– Avaliação Histológica dos Ovários e Útero

Após a decapitação, os ovários e útero foram rapidamente removidos. Posteriormente, os órgãos foram fixados em PBS-formol com pH 7,4. Em seguida, os tecidos foram desidratados em etanol, clarificados com xilol e embebidos em parafina 60 °C. Em seguida, os blocos de parafina foram cortados em micrótomo (Leica RM 2125 RTS), obtendo 3 secções (5 µm)/animal, com 50µm de distância entre elas.

3.5a – Hematoxilina e Eosina

Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina e avaliadas pelo Programa AxioVision Rel. 4.8, na Câmera AxioCam ERc5s acoplada ao Microscópio Olympus AX70.

Em cada ovário, os folículos e corpos lúteos foram contados em três cortes por animal e o número foi amostrado por unidade de área (mm²), como descrito por Guerra *et al.*, (2010). A classificação desses folículos foi feita de acordo com Borgeest *et al.*, (2002). Os folículos ovarianos foram caracterizados como: primordiais, circundado por uma camada de células foliculares pavimentosas; primários, circundado por uma camada de células foliculares cúbicas; pré-antrais, apresentaram de duas a quatro camadas de células da granulosa, sem espaço antral; antrais, apresentaram três ou mais camadas de células da granulosa e um espaço antral bem definido; corpo lúteo, altamente vascularizado, com células da granulosa e da teca modificadas; os folículos atrésicos e císticos foram definidos de acordo com Shi *et al.* (2009), onde os folículos atrésicos apresentaram células da granulosa desorganizadas, com núcleos picnóticos, ovócitos degenerados e desorganizados, enrugamento da membrana celular e deslocamento da membrana basal; os folículos císticos foram definidos como dilatados, cheios de líquido folicular e revestidos com camadas de células da granulosa redondas ou achatadas. Classificamos como folículo cístico, os folículos atrésicos que não apresentaram antro, apenas para diferenciar atresia em estágios mais iniciais ou mais tardios.

Para a morfometria uterina, 5 regiões diferentes foram analisadas em cada uma das 3 secções e foi mensurado a espessura do miométrio e endométrio.

3.5b – Alcian Blue

Esta análise tem como objetivo marcar os mastócitos presentes no tecido, possibilitando que sejam quantificados. Para tanto, cortes de ovário e útero foram corados com *Alcian Blue* de acordo com o protocolo padrão (Sigma-Aldrich Co, LLC). Cada corte de 5 µm foi usado para obter 20 fotomicrografias com aumento de 40x. O número de células com coloração positiva (ie. células contendo grânulos citoplasmáticos roxos) no tecido foi avaliado. As áreas analisadas foram selecionadas

aleatoriamente, com exceção de campos contendo vasos sanguíneos de tamanho médio foram evitadas. O número de células coradas foi expresso por unidade de área (mm^2), como descrito em estudos prévios (Bertuloso *et al.*, 2015).

3.5c – Picro-sirius Red

Esta análise tem como objetivo de quantificar a deposição de colágeno no tecido em estudo. Para isso cortes de ovário foram corados com a coloração *Picro-sirius red*, de acordo com outros trabalhos do nosso grupo (Podratz *et al.*, 2015; Sena *et al.*, 2017). Foram obtidas 20 fotomicrografias com aumento de 40x10. Para a quantificação de colágeno foi utilizado o programa *Image-Pro Plus 6.0*. Os resultados foram expressos com porcentagem de área marcada com a coloração.

3.6– Oil Red O

A técnica de Oil Red O tem como objetivo marcar as gotículas lipídicas presentes no tecido, pois é um corante que se dissolve em lipídeos neutros. Para isso, os ovários foram dissecados, embebidos em Tissue-Tek CRYOOCT (Fisher Scientific), congeladas e cortadas na espessura de 7 μm usando um criostato (Jug CM1850; Leica). Para cada animal, os ovários foram montados em lâminas revestidas com gelatina e coradas usando *Oil Red-O* (Sigma-Aldrich). Gotículas de lipídios foram quantificadas usando um microscópio Olympus acoplado a uma câmera Evolution e um sistema de análise de imagens (*Image-Pro Plus 6.0*). A área das gotículas de lipídios por secção é expressa como a porcentagem da área do ovário que foi analisada.

3.7- Microscopia Eletrônica de Transmissão

As amostras de ovário foram prefixadas em 2 % de fixador de glutaraldeído (em pH 7,4 PBS durante 10 horas a 4° C) e pós-fixadas em 1 % de tetróxido de ósmio (em pH 7,4 PBS durante 30 minutos a 4 °C). Em seguida, as amostras foram desidratadas em série gradual de acetona e incorporadas em epon. Secções ultrafinas, 50 - 60 nm, foram cortadas com um ultramicrotomo Power tomex (produto Rmc, AZ, EUA). As secções foram montadas numa grade de cobre e coradas com acetato de uranil e

citrato de chumbo. As secções de tecido foram examinadas utilizando um microscópio electrónico JEOL (JEM-1400, Japão) (EM) (Pereiro *et al.*, 2014).

3.8 – Análises Bioquímicas

3.8a – Atividade de Mieloperoxidase (MPO)

Esse protocolo foi utilizado para análise de processo inflamatório, uma vez que a mieloperoxidase (MPO) é uma enzima encontrada nos grânulos de neutrófilos (Mullane *et al.*, 1985). Para isso os ovários e úteros foram homogeneizados em PBS pH 4,7 e centrifugados (10.000 rpm a 4 °C por 10 min). O sobrenadante foi desprezado e foi adicionado NaCl 0,2 % p/v ao precipitado remanescente; seguido de NaCl 1,6 %/ glicose 5% p/v. Após nova centrifugação, o precipitado remanescente foi ressuspensionado em PBS, pH 5,4. Após homogeneização as amostras passaram por processo de congelamento/descongelamento em nitrogênio líquido. Em seguida, foi adicionado às amostras o substrato tetrametilbenzidina (TMB) diluído em DMSO (Sigma-Aldrich, St Louis, USA), sendo adicionado H₂O₂ 0,003 % e incubando as amostras a 37 °C por 5 minutos. A reação foi interrompida pela adição de H₂SO₄ 4M. A leitura da absorbância foi feita em 450 nm (Araújo *et al.*, 2010).

3.8b – Atividade de N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG)

A N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG) é uma enzima lisossômica intracelular liberada por macrófagos ativados (Reiner *et al.*, 1981). Dessa forma, esse protocolo possui a finalidade de observar processos inflamatórios. Para tanto os ovários e úteros foram homogeneizados em solução salina 0,9 %/ Triton x-100 0,1 % v/v. Em seguida foram centrifugados (10.000 rpm a 4 °C por 10 min) e o sobrenadante coletado. Posteriormente, as amostras foram diluídas em tampão citrato/fosfato, pH 4,5, adicionado o substrato P-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosaminida (Sigma) seguindo um período de incubação a 37 °C por 10 minutos. Após essa etapa, a reação foi interrompida pela adição de tampão glicina 0,2 M, pH 10,6. Por fim, a leitura da absorbância foi realizada em 400 nm (Barcelos *et al.*, 2005).

3.8c – Atividade da Glutathione Redutase (GSH)

A Glutathione redutase é a enzima responsável pela redução da Glutathione oxidada. Essa enzima, possui importante papel na defesa das células contra o estresse e eliminação, biotransformação e eliminação de xenobióticos e na defesa das células contra o estresse oxidativo (Joseph *et al.*, 1997). Nessa análise, as amostras de ovário e útero foram recolhidas e preparadas para ensaio de quantificação reduzida de glutathione (GSH). Resumidamente, os níveis de glutathione foram medidos espectrofotometricamente por reação com o reagente de Ellman DTNB (ácido 5, 50-ditiobis-2-nitrobenzóico, Sigma, EUA), como descrito por Coutinho *et al.* (2016).

3.9 - Avaliação do estresse oxidativo

Para a detecção dos níveis de ânion superóxido (O_2^-), as amostras de ovário e útero criopreservadas foram descongeladas e embebidas em Tissue-Tek CRYOOCT (Fisher Scientific). Os blocos foram cortados em seções de 8 μm e os cortes foram incubados com corante fluorescente Dihidroetidio (DHE), sensível a O_2^- , a 37 °C por 30 minutos em ambiente escuro (Rodrigues *et al.*, 2014). As imagens foram obtidas utilizando um microscópio Leica com fluorescência detectada a 585 nm (DM 2500). A intensidade da fluorescência indica a produção de O_2^- , e foi analisada em 20 seções com o programa *Image J*. O processamento e análise microscópica foi realizado no Laboratório de Histologia Molecular e Imunohistoquímica (LHMI), UFES. O nível de produção de O_2^- indica o estresse oxidativo.

3.10 – RT-qPCR

Realizou-se o RT-qPCR em tempo real para determinar os níveis do RNAm de expressão da proteína reguladora aguda esteroideogênica (StAR), do citocromo P450 aromatase (Arom), da Lipina-1, da proteína potencializadora de ligação/CCAAT (C/EBP β) nos ovários CON e TBT. Os animais foram decapitados e os ovários foram dissecados e armazenados a -80 °C até a quantificação utilizando protocolos modificados por Merlo *et al.* (2016) e Sena *et al.* (2017). O RNA foi isolado a partir destes tecidos utilizando o Reagente de Isolamento de RNA TRI-Reagente (Sigma-Aldrich), de acordo com o protocolo fornecido pelo fornecedor. 01 μg de RNA foi

transcrita inversamente utilizando um kit de cDNA iScript (Bio-Rad). Realizou-se RT-qPCR em triplicada utilizando SYBR Green Master Mix (Bio-Rad) e uma máquina qPCR CFX96 (Bio-Rad). Os iniciadores utilizados para amplificar os genes alvo examinados estão mostrados na Tabela 1. Por fim, quantificamos os níveis de expressão de cada gene alvo em relação à β -actina (gene de manutenção) na mesma amostra seguindo o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak e Schmittgen 2001)

Tabela 1: *Primers* usados para a análise da expressão de genes por RT-qPCR

Gene	<i>Sense primer</i>	<i>Antisense primer</i>
StAR	AAGGTTTCATAGATACCTGTCCCTTAA	AGGAAAACAGAACTGAGGCTTAGAATA
AROM	AGAGCATGTTAGAGGTGTCCAGC	AGAGGAGACACTCATTATCAGCAA
Lipin-1	CCCTCGATTTC AACATATCCC	GCAGCCTGTGGCAATTCA
C/EBP β	ATGCAATCCGGATCAAACGT	CCGCAGGAACATCTTTAAGTGA
β -actin	ACAACCTTCTTG CAGCTCCTC	GCCGTGTTCAATGGGGTACT

StAR: proteína reguladora aguda esteroideogênica; AROM: aromatase - citocromo P450; C/EBP β : proteína potencializadora de ligação/CCAAT β

3.11 – Western Blotting

Para avaliar a expressão proteica, as amostras de ovário e útero foram homogeneizadas em solução tampão de lise, conforme Bertuloso *et al* (2015). O homogeneizado foi centrifugado e o sobrenadante resultante guardado e utilizado para determinação da concentração de proteína (Lowry *et al.*, 1951). As proteínas foram solubilizadas a 100 °C por 1 min em tampão de amostra (62.5 % Tris-HCl, pH 6.8, 2 % SDS, 5 % de 16 % glicerol, 0.01 % de azul de bromofenol e 1.7 % β -mercaptoetanol). Foi feita a eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS padrão (PAGE 10 %) carregando quantidades iguais de proteínas (100 μ g), e transferindo-as para membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, Hercules, CA) em tampão de transferência tris-glicina. Em seguida, as membranas foram bloqueadas (albumina e/ou leite em pó desnatado 5%-PBS), incubadas com anticorpos primários para CYP11A1 (sc28205, 1:500, SCBT, INC); ER α (ER- α , sc542; 1: 500, SCBT, INC); PPAR γ (sc-7273, 1: 500, SCBT, INC), lavadas em PBS, incubadas com o anticorpo secundário anti-coelho IgG conjugada a

fosfatase alcalina (A3687, 1:1000; Sigma-Aldrich Co, LLC) e anti-camundongo IgG conjugado a fosfatase alcalina (A3562, 1:1000; Sigma-Aldrich Co, LLC); e revelados com o BCIP/NBT (Santa Cruz Biotechnology, INC). As bandas foram analisadas por densitometria utilizando o software *Image J*. A expressão relativa foi normalizada dividindo os respectivos valores pelo controle positivo correspondente (GAPDH).

3.12 - Análise estatística

Para a análise estatística utilizamos o programa estatístico GraphPad Prism 5. Os dados foram analisados quanto à normalidade e apresentados na forma de média \pm erro padrão da média (EPM). O teste de normalidade usado foi o D'Agostino & Pearson omnibus. Para valores Gaussianos, utilizamos o teste *t Student* (não pareado), para comparações entre dois grupos, e ANOVA (uma via), seguido pelo teste de Tukey, para comparações de mais de dois grupos e/ou variáveis (como a análise do ciclo e contagem dos folículos). Valores não Gaussianos foram analisados por teste *t Student* (não-pareado), seguido pelo teste Mann-Whitney. A significância estatística foi considerada quando $p < 0.05$ (programa estatístico Prisma 5.0).

4 – Resultados e Discussão

4.1 – Ciclo Estral, Dosagem Hormonal e Peso dos Órgãos

Antes do tratamento com o TBT, todos animais apresentaram ciclo estral regular, com duração aproximada de 5 a 6 dias. Após o início do tratamento com TBT, observamos desde o primeiro ciclo um padrão anormal de ciclagem (Figura 1A), com ciclos incompletos e/ou muito longos.

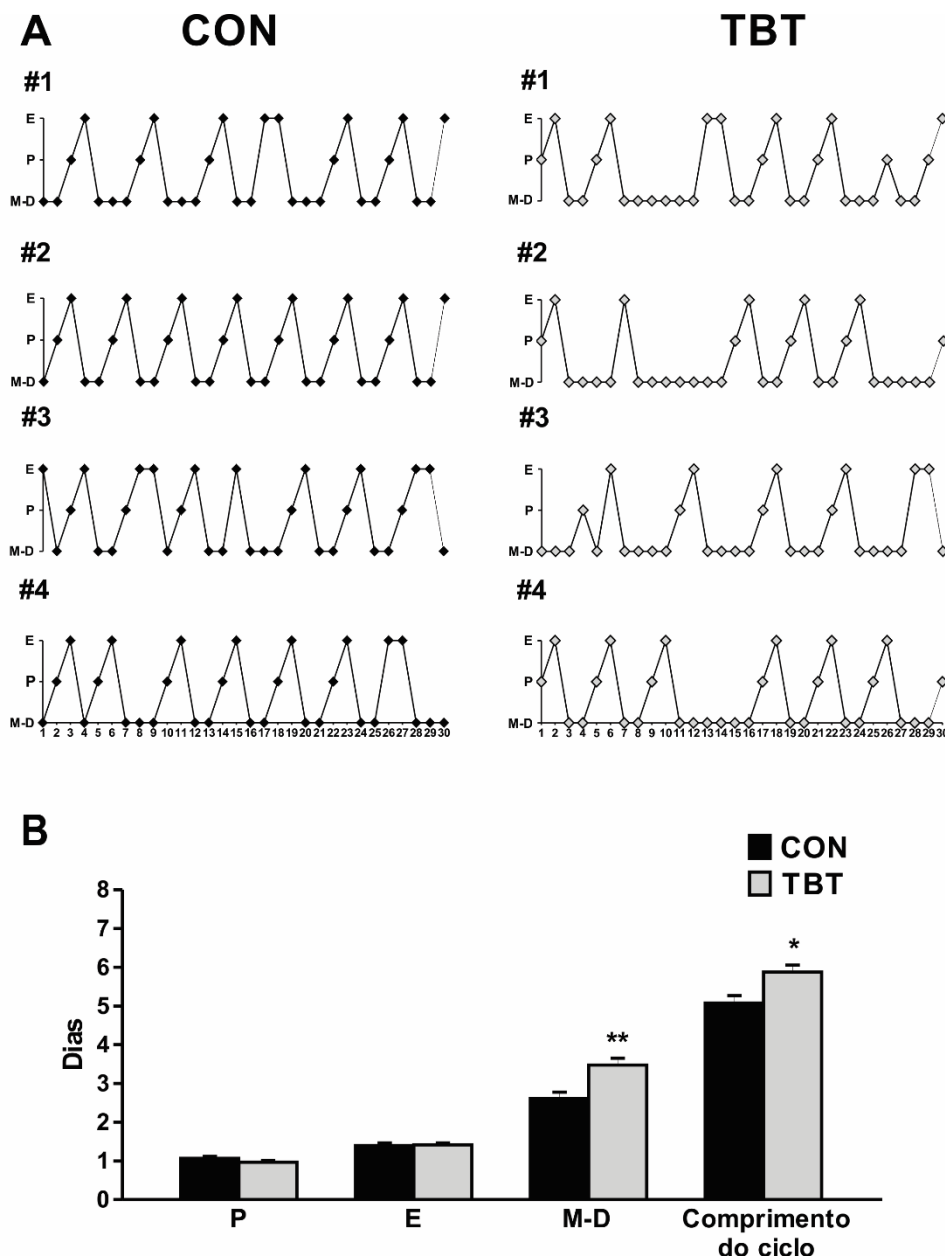


Figura 1: Os ratos TBT têm um ciclo estral anormal. (A) A representação gráfica do ciclo estral nos ratos CON e TBT, determinada por citologia vaginal durante 30 dias (n = 10). (B) Uma representação gráfica do número de dias em cada estágio do ciclo estral e do comprimento total do ciclo. Proestro (P), estro (E), metaestro-diestro (M-D). * p<0.05, ** p<0.01 vs. CON (teste t de Student).

A exposição ao TBT alterou significativamente a regularidade do ciclo estral, durante os 30 dias de tratamento. Os animais do grupo Controle exibiram uma média de 6 a 7 ciclos, enquanto que os animais tratados com o TBT apresentaram uma média de 4 a 5 ciclos, demonstrando um possível prejuízo causado pelo tratamento. Na análise individual da duração das fases, foi observado que não houve alteração significativa na duração de estro e proestro, enquanto que, em metaestro-diestro (M-D) a fase ficou mais longa (CON: $2,61 \pm 0,17$; TBT: $3,47 \pm 0,18$, $p < 0.01$), em alguns animais durando mais da metade dos dias de tratamento (Figura 1A – TBT #3). A fase M-D nesse trabalho, se caracteriza pela junção das fases de metaestro 1, metaestro 2 e diestro, devido à dificuldade encontrada na diferenciação dessas fases nos animais tratados, elas foram representadas juntas. A identificação das fases foi baseada no artigo de Nelson et al. (1982), porém a junção em M-D foi padronizada em nosso grupo para reduzir erros de identificação, sendo demonstrado primeiramente por Podratz *et al.* (2015). Devido a esse aumento na fase de M-D, e manutenção na duração das outras fases, foi observado aumento na duração do ciclo reprodutivo dos animais tratados, enquanto no grupo controle, a duração do ciclo se manteve normal (CON: $5,08 \pm 0,18$; TBT: $5,88 \pm 0,18$, $p < 0,05$) (Figura 1B). Resultados semelhantes já foram demonstrados em trabalhos anteriores do nosso grupo. Podratz *et al.* (2012) e Sena *et al.* (2017) relataram que o tratamento com 100 ng/Kg de TBT por 15 dias leva à ciclicidade estral anormal, com os ratos passando mais tempo na fase metaestro-diestro (M-D), e um aumento geral no comprimento do ciclo nos ratos TBT.

Além de problemas no ciclo, os animais do grupo TBT apresentaram anormalidades biométricas (Tabela 2). O peso corporal inicial foi semelhante entre os ratos CON e TBT. No entanto, o peso corporal final das ratas TBT foi maior em comparação ao controle (CON: $219,25 \pm 1,69$; TBT: $241,00 \pm 3,89$, $p < 0.001$). Porém, não foram observadas alterações nos pesos do coração, nos pulmões, no baço, no pâncreas, no fígado, nas glândulas adrenais ou nos rins (para pesos úmidos e secos) entre os grupos. As ratas TBT apresentaram menor peso seco de ovário e útero em comparação com o grupo CON (ovário: CON: 0.009 ± 0.01 ; TBT: 0.006 ± 0.01 , $p < 0,05$; útero: CON: 0.09 ± 0.01 ; TBT: 0.08 ± 0.01 , $p < 0,01$). O peso da gordura parametrial foi maior nas ratas TBT em comparação com as CON (CON: 3.59 ± 0.5 ; TBT: 6.08 ± 0.52 , $p < 0,05$). Não foram observadas alterações no peso das gorduras retroabdominal, perirrenal e retroperitoneal entre os grupos.

Tabela 2: Avaliação do peso corporal e tecidos.

Pesos (g) (n=10)	CON	TBT
Peso Corporal Final	219.25 ± 1.69	241.00 ± 3.89***
Coração	0.88 ± 0.02	0.89 ± 0.04
Coração – peso seco	0.18 ± 0.01	0.20 ± 0.01
Pulmão	1.51 ± 0.02	1.66 ± 0.08
Pulmão - peso seco	0.28 ± 0.02	0.31 ± 0.03
Baço	0.57 ± 0.01	0.56 ± 0.02
Baço - peso seco	0.12 ± 0.01	0.13 ± 0.01
Pâncreas	0.46 ± 0.03	0.54 ± 0.04
Pâncreas - peso seco	0.33 ± 0.16	0.20 ± 0.02
Fígado	7.23 ± 0.12	7.44 ± 0.24
Fígado - peso seco	2.52 ± 0.04	2.73 ± 0.17
Adrenal	0.17 ± 0.01	0.17 ± 0.02
Adrenal - peso seco	0.02 ± 0.02	0.02 ± 0.01
Rim	1.52 ± 0.05	1.46 ± 0.04
Rim - peso seco	0.31 ± 0.05	0.31 ± 0.05
Ovário	0.072 ± 0.003	0.069 ± 0.003
Ovário - peso seco	0.009 ± 0.01	0.006 ± 0.01*
Útero	0.44 ± 0.03	0.50 ± 0.03
Útero - peso seco	0.09 ± 0.01	0.08 ± 0.01**
Gorduras		
Parametrial	3.59 ± 0.5	6.08 ± 0.52*
Retroabdominal	1.28 ± 0.13	1.85 ± 0.07
Perirrenal	2.42 ± 0.09	3.0 ± 0.39
Retroperitoneal	3.19 ± 0.21	3.82 ± 0.26

Valores expressos como media ± EPM. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ vs. CON (teste t de Student)

Segundo a Agência de Proteção Ambiental Americana (US-EPA, 1997), essas alterações no peso ovariano podem estar relacionadas à presença de cistos, depleções

de folículos ovarianos e ainda, modificações na modulação do hipotálamo e/ou hipófise. Trabalhos prévios vêm demonstrando que a exposição ao TBT dose-dependente, leva a alterações no peso dos órgãos reprodutivos de roedores (Wester *et al.*, 1990, Grote *et al.*, 2009, Lee *et al.*, 2012; Sena *et al.*, 2017). Trabalhos do nosso grupo, vem demonstrando que a dose de 100 ng/Kg de TBT causa aumento no peso corporal dos animais, além de alterações no peso das gorduras (Bertuloso *et al.*, 2015; Coutinho *et al.*, 2016).

A alteração de peso de ovário e útero, bem como sua gordura associada, parametrial, pode indicar que os órgãos reprodutivos sofrem grande influência da toxicidade desse xenobiótico. Porém, a manutenção nos pesos dos demais órgãos não está em concordância com alguns trabalhos anteriores. Cooke *et al.* (2004) registraram diminuição de peso em órgãos como timo, baço e fígado de ratos que sofreram exposição ao TBTCI *in útero*, a partir do oitavo dia de gestação e durante a lactação, com doses de 0,025; 0,25 e 2,5 mg/Kg. Por outro lado, doses mais elevadas, como demonstrado por Baroncelli *et al.* (1995) ao administrar doses de 40 mg/Kg de TBTO, Noda *et al.* (1991) ao administrar 16 mg/Kg de TBTA e Ema *et al.* (1995) ao administrar 25 e 100 mg/Kg de TBTCI, provocam efeitos tóxicos que promovem alterações viscerais, comprometem a estrutura do esqueleto, e ainda apresentam potencial teratogênico tanto em ratos como em camundongos. Ogata *et al.* (2001) observaram que ratas, após tratamento com doses variadas de TBTCI, apresentaram índice de fertilidade normal, mas com redução no número de fetos vivos, e diminuição no peso corporal dos filhotes. Além de comprometer o aumento de peso gestacional, esses animais apresentavam redução no peso dos ovários, aumento no peso uterino e irregularidades no ciclo estral.

Sabe-se que o TBT desempenha um papel direto no funcionamento anormal dos órgãos reprodutivos, como as gônadas (Wester *et al.*, 1990; Kishta *et al.*, 2007; Si *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2012). As gônadas são responsáveis pela produção de gametas e hormônios esteroidais, ambos afetados pela exposição ao TBT (Kishta *et al.*, 2007; Saitoh *et al.*, 2001). Esses dados são semelhantes aos observados na figura 2, em que é possível notar um desbalanço nos níveis de hormônios sexuais das ratas. No entanto, não encontramos diferenças nos níveis séricos de gonadotrofinas, LH e FSH, basais (Figura 2A e B) no presente estudo. Em contraste, nota-se diferenças consideráveis entre os níveis de hormônios sexuais entre os grupos controle e TBT. É possível observar aumento nos níveis séricos de progesterona (CON: $4,85 \pm 0,26$; TBT:

18,55 ± 2,54 ng/mL, $p < 0,01$ – Figura 2C) e testosterona (CON: 0,25 ± 0,03; TBT: 0,34 ± 0,03 ng/mL, $p < 0,05$ – Figura 2E), acompanhado de redução nos níveis séricos de estrogênio (CON: 45,87 ± 2,12; TBT: 22,58 ± 0,96 pg/mL, $p < 0,001$ – Figura 2G).

Como mencionado anteriormente, o LH irá estimular a atividade da aromatase nas células tecais, além de participar da ovulação e formação do CL. Enquanto que o FSH irá estimular a diferenciação das células da granulosa e a conversão de andrógenos a estrógenos pela aromatase (Richards *et al.*, 2002). Dessa forma, as reduções nos níveis de estrogênio deveriam resultar em elevação nos níveis de FSH, devido ao mecanismo de Feedback negativo desses hormônios. Esses resultados contraditórios nos levam a concluir que existe algum problema na ativação do eixo Hipotálamo-hipófise-gônadas (HPG). Uma vez que o objetivo do trabalho era avaliar os prejuízos do TBT especificamente em ovários e útero, não investigamos o eixo. No entanto, apesar de existirem poucos trabalhos, a literatura demonstra que o TBT interage com os eixos hipotalâmicos (Merlo *et al.*, 2016; Sena *et al.*, 2017; Santos-Silva *et al.*, 2018). Sena *et al.* (2017), observou reduções nos níveis de LH basal, redução na expressão de RNAm de GnRH, além de alterações nos hormônios sexuais, mostrando que esse contaminante interfere em diferentes níveis do eixo HPG.

Uma vez que no ciclo estral regular, o estradiol tem atuação máxima na fase de proestro, pode-se inferir que a redução hormonal estaria influenciando na regularidade do ciclo estral (Figura 1). É sabido, que no ciclo de ratas, o pico de progesterona ocorre no final da fase do proestro e início do estro, retornando a valores basais durante o metaestro e diestro (Goldman *et al.*, 2007). Esse fato, poderia sugerir que a ação da progesterona se estenda a fase M-D, mantendo o nível de células cornificadas elevadas após o tratamento com TBT. As anormalidades nos níveis de hormônios sexuais reafirmam as alterações encontradas no ciclo estral, uma vez que Sportnitz *et al.*, (1999) demonstraram que o nível de estrogênio tem seu aumento iniciado na fase de metaestro, sendo o pico hormonal durante o proestro e retornando às concentrações basais na fase do estro. Além disso, Schoenfelder *et al.* (2003) relataram níveis maiores de progesterona, testosterona e estrogênio em células de ovário bovino expostas a TBT 50 pM por 24 h.

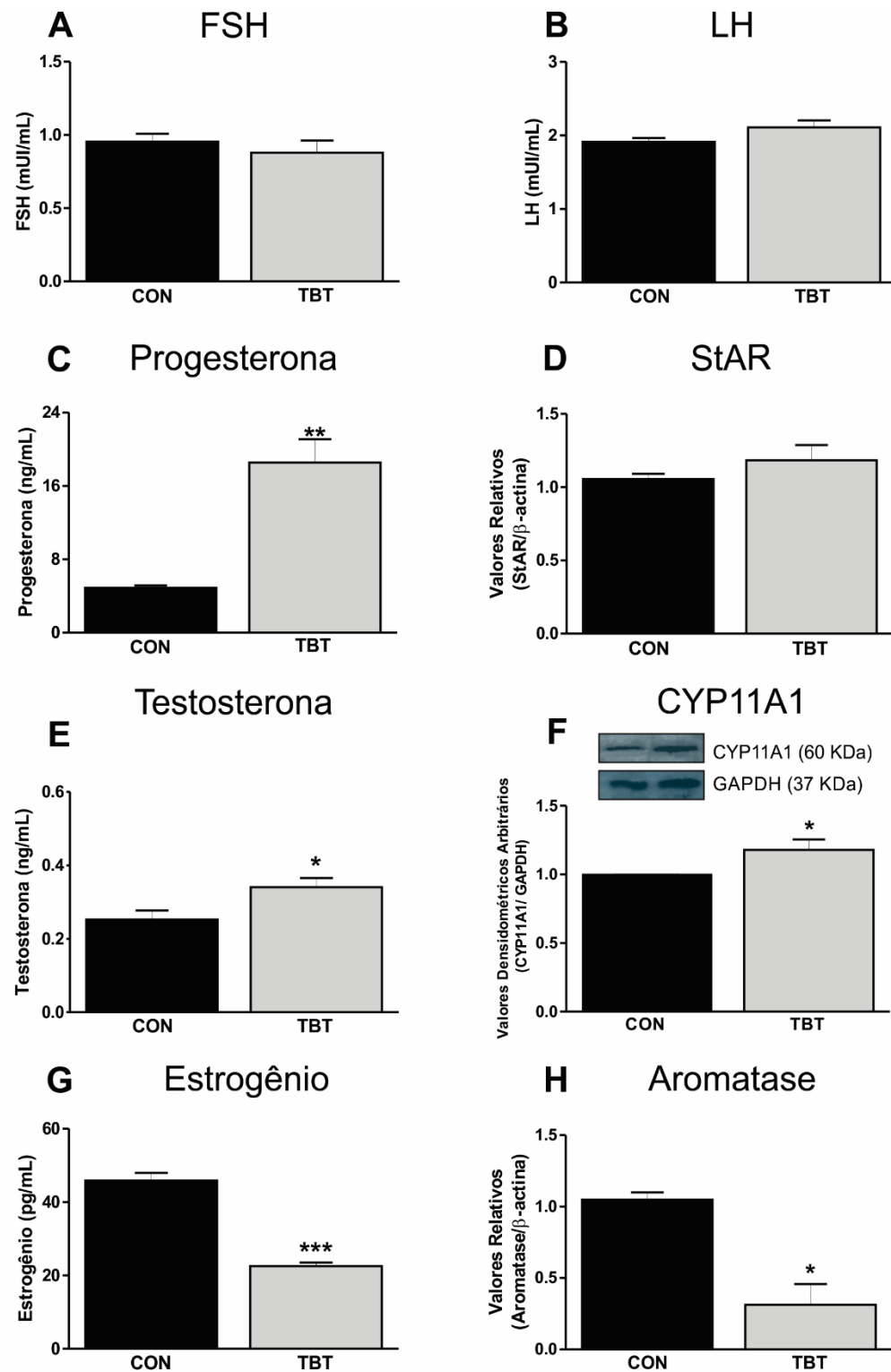


Figura 2: Gonadotrofinas, hormônios sexuais ovarianos e expressão enzimática esteroidogênica em ratas (n = 5). (A) Níveis basais séricos de FSH. (B) Níveis basais séricos de LH. (C) Aumento dos níveis séricos de progesterona nos ratos TBT. (D) expressão de mRNA de StAR no ovário das ratas CON e TBT. (E) Aumento dos níveis séricos de testosterona no grupo TBT. (F) Aumento da expressão da proteína CYP11A1 nos ovários TBT. (G) Redução dos níveis séricos de estrogênio nas ratas TBT. (H) Expressão reduzida de mRNA da aromatase nos ovários das ratas TBT. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. CON (teste t de *Student*). StAR: proteína reguladora aguda esteroidogênica. CYP11A1: enzima de clivagem da cadeia lateral de colesterol.

Essas diferenças hormonais já foram associadas aos efeitos tóxicos do TBT no controle estereoidogênico (Saitoh *et al.*, 2001, Ahn *et al.*, 2007), isso nos levou a analisar alguns passos da via estereoidogênica, como possível explicação para esses valores hormonais encontrados. Assim, ao analisarmos, por PCR-RT, a expressão de StAR (Figura 2D), não encontramos diferença entre os grupos. Porém, os níveis proteicos de CYP11A1 estão aumentados nos animais tratados (CON: $1,0 \pm 0,01$; TBT: $1,18 \pm 0,08$, $p < 0,05$ – Figura 2F). Em contrapartida, os níveis de expressão de RNAm da Aromatase estão reduzidos (CON: $1,0 \pm 0,05$; TBT: $0,31 \pm 0,15$, $p < 0,05$ – Figura 2H). Uma característica comum dos efeitos da TBT sobre a esteroidogênese é o grau variável de irregularidades, possivelmente resultante da sensibilidade e / ou controle da expressão enzimática anormal em diferentes modelos que também dependem de espécies, sexo, idade, dose de TBT e o tempo e tipo de produto químico utilizado (Saitoh *et al.*, 2001; Ohno *et al.*, 2005; Yamazaki *et al.*, 2005; Ahn *et al.*, 2007; Sena *et al.*, 2017).

No entanto, nossos dados são corroborados por trabalhos anteriores. Saitoh *et al.* (2001) relataram que a exposição a 20 ng/mL de TBT por 48 h reduziu a expressão de RNAm da aromatase, bem como os níveis de estrogênio em linhagens de células tumorais, como granulosa humana (KGC line). Da mesma forma, Ahn *et al.* (2007) mostraram que o TBT suprimiu a conversão de testosterona em estrogênio, nos folículos ovarianos de rã (*Rana catesbeiana*), pela inibição da aromatase, dose-dependente (0,01-100 μ M por 18 h). Por tanto, é possível deduzir que o TBT leva a irregularidades na via esteroidogênica, culminando nos prejuízos hormonais e alterações encontradas no ciclo estral.

4.2 – Análise Histológica

Além das alterações no peso, encontramos modificações microscópicas no tecido ovariano dos animais tratados com TBT em relação ao controle (Figura 3). As ratas do grupo controle apresentaram ovários com aspecto normal (Figura 3, com folículos primordiais, primários, pré-antrais, antrais e CL com estruturas de aspecto normal (Figura 3A, A1 e A2). No entanto, os animais expostos ao TBT apresentaram ovários com estrutura bem diferentes do controle (Figura 3B, B1, B2, B2.1, B3, B3.1). Estudos anteriores demonstraram desenvolvimento folicular ovariano anormal e efeito da sinalização de hormônio sexual na apoptose ovariana em roedores fêmeas expostos à contaminação por TBT e / ou dieta contaminada (Kishta *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2012;

Podratz *et al.* 2015; Sena *et al.*, 2017). Ao analisarmos a histologia desses animais, não encontramos diferenças nos números de folículos primordiais, primários, pré-antrais e atresicos (Figura 3A, B, C e D), porém observamos um aumento na quantidade de folículos císticos (CON: $11,69 \pm 2,75$; TBT: $23,75 \pm 2,29$, $p < 0,01$ – Figura 3C), atresicos (CON: $4,62 \pm 0,52$; TBT: $7,20 \pm 0,75$, $p < 0,01$ – Figura 3D) e redução do CL (CON: $4,75 \pm 0,44$; TBT: $2,91 \pm 0,47$, $p < 0,01$ – Figura 3E). Essa redução do CL pode estar associada ao aumento de folículos atresico, visto que muitos não estão conseguindo chegar ao estágio final do desenvolvimento. Além disso, esse aumento da atresia pode estar associado a problemas na maturação dos folículos, redução de E_2 e aumento da testosterona, e possivelmente, contribuindo para o prolongamento da fase de M-D.

Já é bem estabelecido na literatura que o estrogênio participa da retroalimentação negativa com o FSH no processo de dominância folicular, esse processo, juntamente com a maior sensibilização ao FSH, contribui para a seleção de um folículo que completará o seu desenvolvimento naquele ciclo. Dessa forma, as baixas concentrações de estrogênio (Figura 2G) prejudicam o desenvolvimento folicular, aumentando o número de folículos atresicos (Figura 3D) presentes nesse ovário. A atresia folicular é o mecanismo de eliminação de folículos que iniciaram o desenvolvimento folicular, mas não conseguiram atingir a ovulação. A atresia ocorre desde a vida fetal, até a menopausa e pode ser causada pela inversão da relação estrogênio/androgênio no folículo, provocando hiperandrogenismo. Esse processo pode ser potencializado pela redução da ação da Aromatase, pois essa enzima, quando estimulada pelo FSH, é responsável por converter os andrógenos provenientes da teca interna, em estrógenos (Franci, C.R.; Anselmo-Franci, J., A., 2008, p. 1068). Dessa forma, a redução da ação da aromatase e níveis de estrogênio, são os responsáveis pelo aumento no número de folículos atresico.

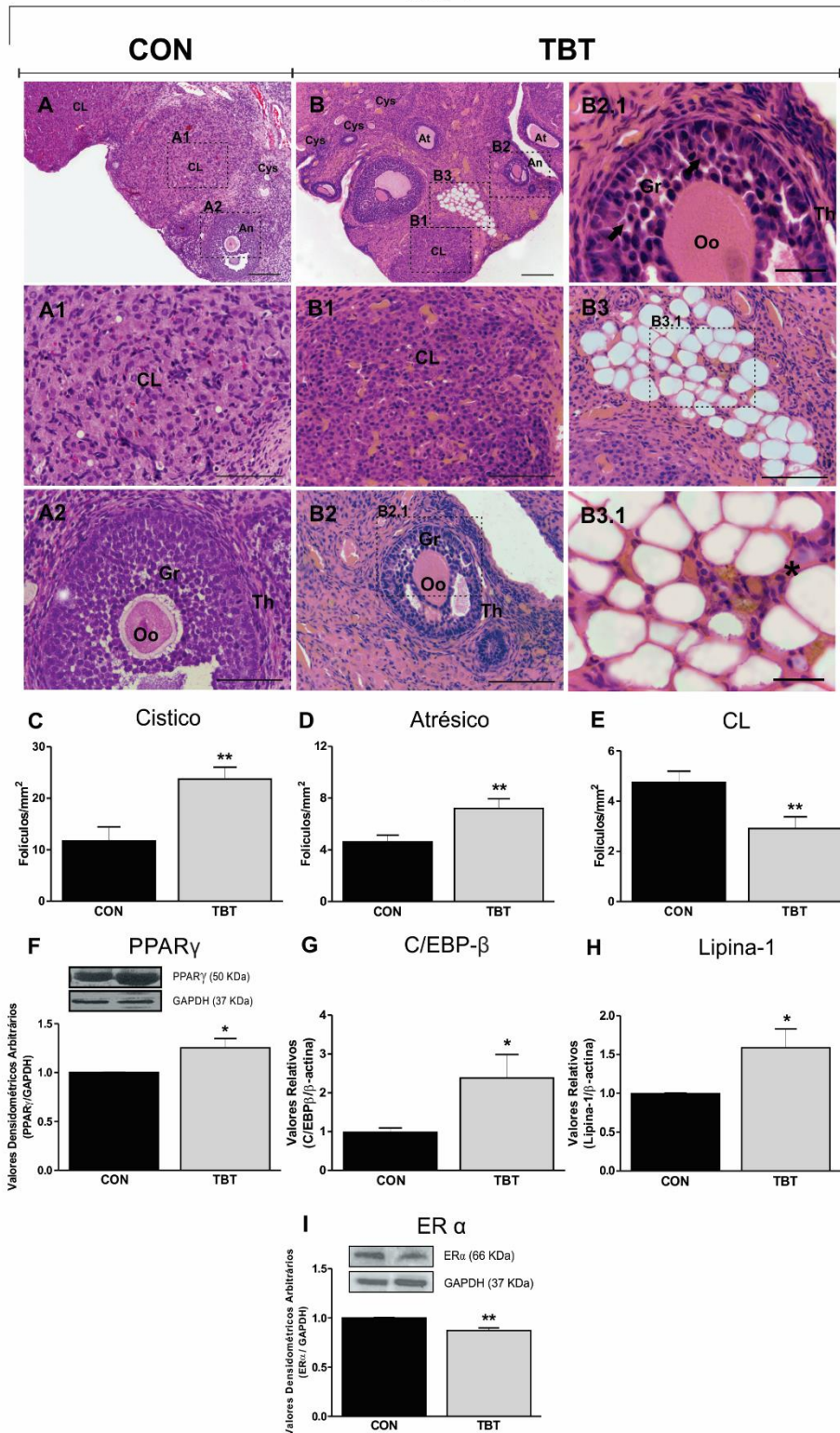


Figura 3: A morfologia do ovário das fêmeas (n = 5). As seções representativas dos ovários TBT (A, A1, A2) e (B, B1, B2, B2.1, B3, B3.1) foram coradas com H & E, foi indicado o corpo lúteo (CL), os folículos císticos (Cys), folículos antrais (An), folículos atrésicos (At), células inflamatórias (asterisco) e células apoptóticas (seta). (C) Aumento dos folículos de Cys de ovário TBT. (D) Aumento dos folículos atrésicos nos ovários TBT. (E) Diminuição do número CL nos ovários TBT. (F) Aumento da expressão da proteína PPAR γ nas ratas TBT. (G) Aumento da expressão de mRNA C/EBP- β . (H) Aumento da expressão de mRNA Lipin-1. (I) Diminuição da expressão da proteína ER α do ovário nos ratos TBT. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. CON (teste t *Student*). Barra = 100 μ m (A, A1, A2, B, B1, B2, B3). Barra = 12,5 μ m (B2.1, B3, B3.1). Oo: Oócito. Gr: célula granulosa. Th: célula de Teca.

Ainda sobre a atresia folicular, um fato interessante é que durante esse processo, degeneração do ovócito, desintegração das células da granulosa e aumento no tamanho e número nas células da teca, o folículo atrésico pode simular um CL. Rubin *et al.*, 1963, demonstraram atividade da enzima $\Delta 5$ -3 β -Hidroxiesteróide desidrogenase na granulosa de folículos atrésicos. Além disso, a observação de gotículas lipídicas contendo colesterol e atividade de hidroxisteroide desidrogenase, mostra que as células da granulosa aparentemente sofrem luteinização abortiva, em resposta a fatores luteinizantes disponíveis durante a atresia (Beltermann 1965, Guraya 1972b).

O CL é uma glândula endócrina temporária, primariamente reconhecido pela habilidade de sintetizar e secretar progesterona (Fields & Fields, 1996). A função normal do corpo lúteo é determinada pelo bom desenvolvimento da fase folicular, bem como da fase lútea. Na fase folicular é necessário um hormônio folículo estimulante (FSH) adequado e estimulação de estrogênio para as mitoses de células da granulosa e a síntese do receptor do hormônio luteinizante (LH), sendo este último também influenciado pelo fator de crescimento transformador- β (Knecht *et al.*, 1987). O aumento da frequência de pulso de LH que ocorre desde a fase lútea tardia até o folicular inicial (Filicori *et al.*, 1986) pode ser necessário para uma síntese de estrogênio adequada e pode haver um aumento preferencial de LH bioativo em algumas circunstâncias (Veldhuis *et al.*, 1987a).

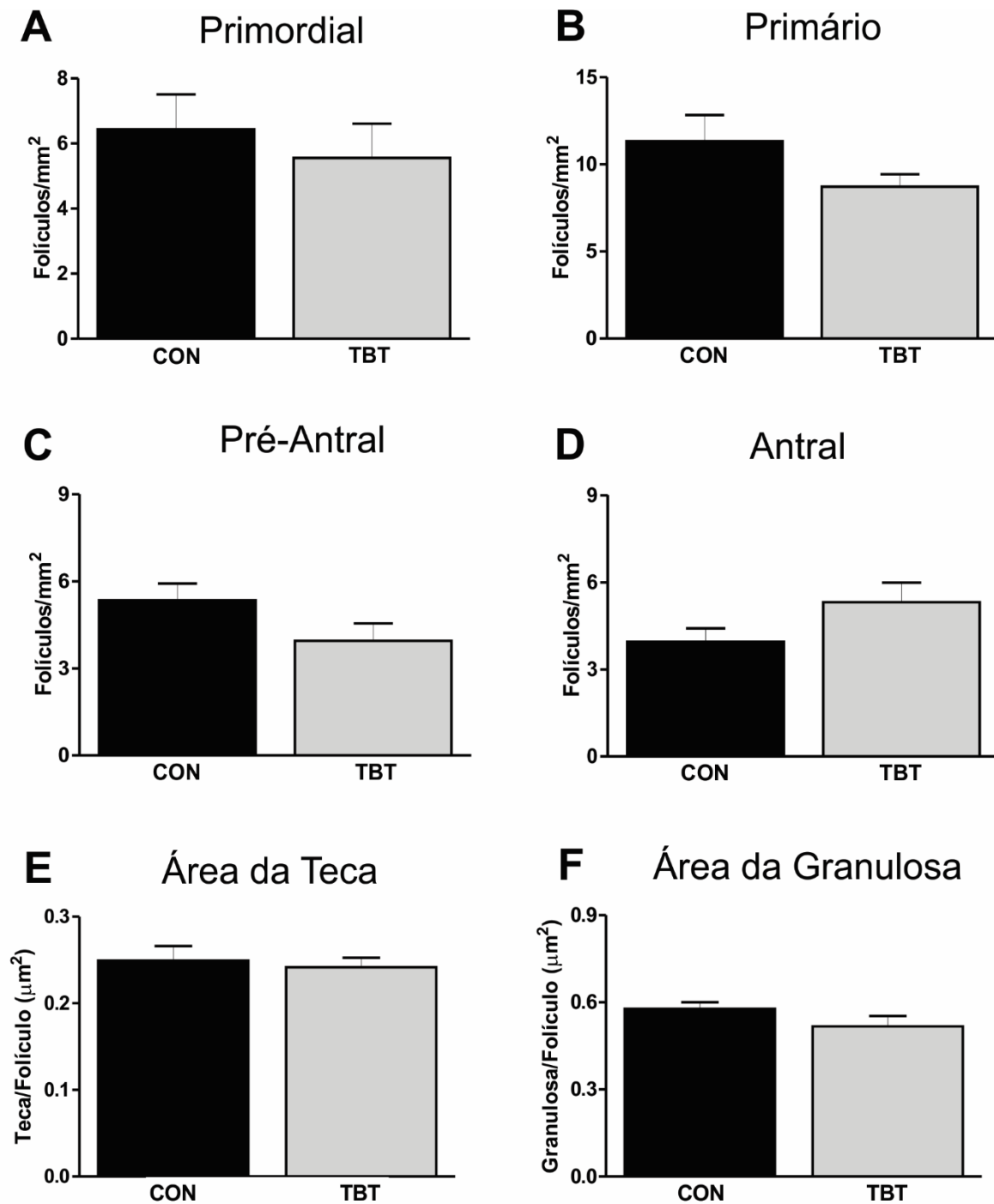


Figura 4: (A, B, C, D) Os folículos primordiais, primários, pré-antrais e antrais ovarianos de CON e TBT, expressos como unidades por área (mm²). (E, F) A área tecal e granulosa dos ovários CON e TBT, analisada e representada como área/folículo (µm²). (teste t *Student*).

Como descrito anteriormente, durante o crescimento folicular as células da teca secretam androgênios que são aromatizados, e serão armazenados no fluido folicular. Esses androgênios vão atuar nas células da granulosa como potencializadores da ação do FSH na atividade de enzimas que produzem estrogênio, ou como substrato para a conversão de estrógenos por estas enzimas (Hickey *et al.*, 2005; Taniguchi *et al.*, 2007). Como demonstrado na Figura 2, essa via se encontra alterada. Por tanto, avaliamos as áreas de teca (Figura 4E) e granulosa (Figura 4F) dos folículos antrais não degenerados, porém, não encontramos diferença entre os grupos. Apesar disso, foi observado aumento na expressão de ER α . Sabe-se que as ações de estrogênio são mediadas, em tecidos específicos, por pelo menos dois receptores nucleares, incluindo ER α e ER β , ambos presentes no ovário de roedores (Couse *et al.*, 1997). O ER β é essencial para a proliferação de células da granulosa, enquanto o ER α desempenha papéis específicos na ovulação e formação de CL (Dupont *et al.*, 2000).

Um outro achado curioso na histologia foi uma estrutura encontrada no estroma dos ovários de animais tratados, muito semelhante a adipócitos (Figura 3B). Estudos vem demonstrando que o TBT possui caráter obesogênico, que induz distúrbios metabólicos pela modulação dos genes adipogênicos, resultando em grau variado de adiposidade dependente do período de exposição (Lee *et al.*, 2012; Chamorro-García *et al.*, 2013; Pereira-Fernandes *et al.*, 2013). Sendo assim, fizemos uma análise da deposição lipídica nesse órgão. Ao analisarmos alguns marcadores adipogênicos, encontramos aumento na expressão de PPAR γ nos animais tratados (CON: $1,00 \pm 0,01$; TBT: $1,25 \pm 0,09$, $p < 0,05$ - Figura 3F). A expressão gênica de C/EBP β (CON: $1,00 \pm 0,1$; TBT: $2,38 \pm 0,60$, $p < 0,05$) e Lipina-1 (CON: $1,00 \pm 0,01$; TBT: $1,59 \pm 0,24$, $p < 0,05$), que estavam aumentados nos animais tratados (Figura 3G e H). Esses dados são corroborados pela literatura, uma vez que o fator obesogênico do TBT está associado à sua afinidade por PPAR γ (Pereira-Fernandes *et al.*, 2013). Além disso, Grun *et al.* (2006) relataram maior acúmulo de lipídios no tecido adiposo, testículos e fígado de camundongos expostos a 0,5 mg/Kg TBT *in útero*. Além de induzir maior atividade de PPAR γ no tecido adiposo, o TBT também modulou os fatores iniciais de diferenciação de adipócitos, como C/EBP- β , em camundongos de 6 semanas de idade tratados com 0,3 mg/Kg de TBT por 24 h.

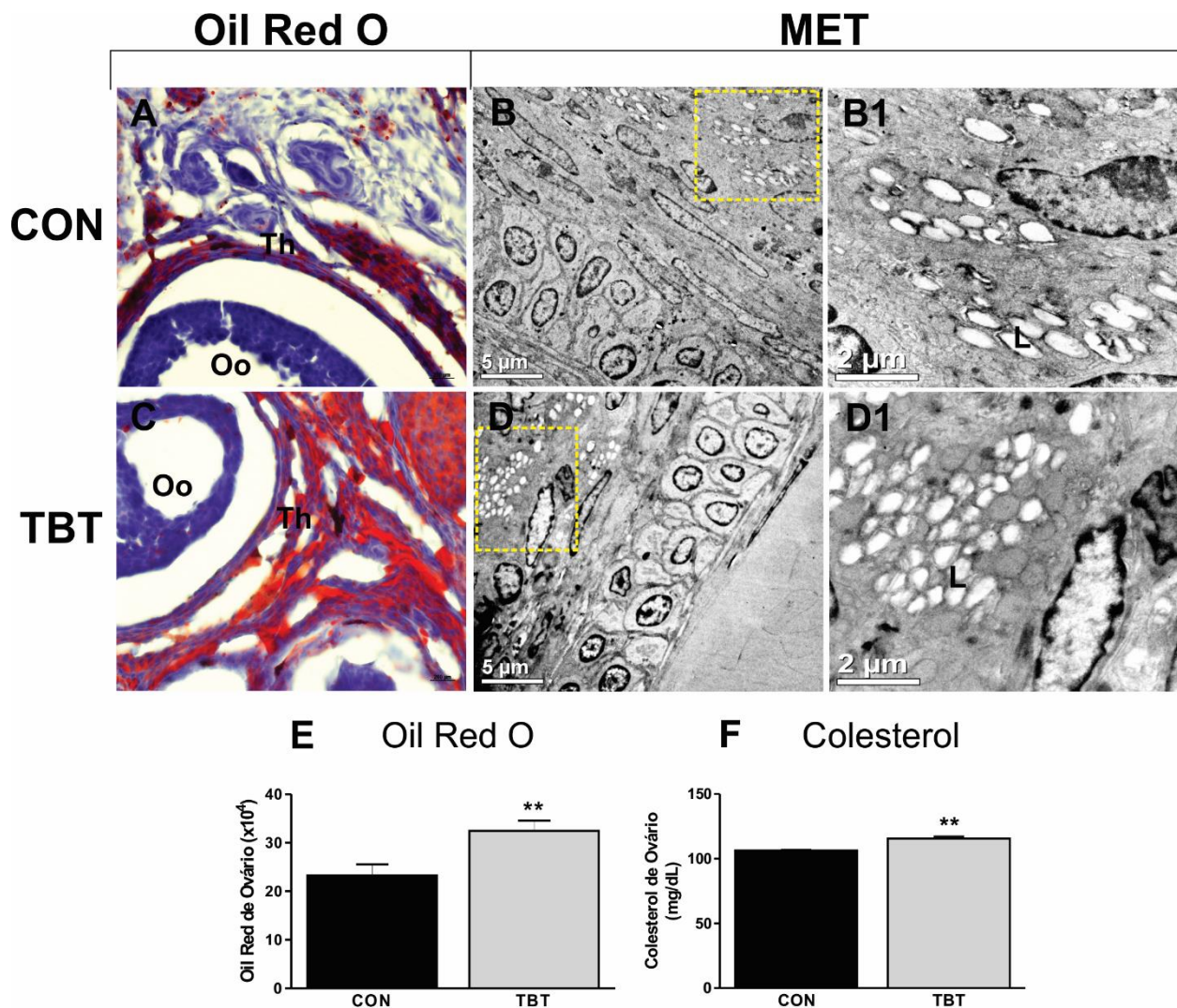


Figura 5: Foram obtidas seções com gotículas lipídicas representativas dos ovários a partir de ratas (A) CON e (C) TBT- usando a coloração de Oil Red O (n = 5). (E) Aumento do acúmulo de gotículas lipídicas foi observado no ovário dos ratos TBT (n = 5). (B, B1) Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) demonstrando o aspecto normal do ovário CON e (D, D1) acumulação anormal de gotículas lipídicas no estroma ovariano TBT (n = 4). (F) Foram observados níveis elevados de colesterol no ovário dos ratos TBT (n = 5). ** $p < 0.01$ vs. CON (teste t de Student). A, C (Barra = 200 μ m). B, D (Barra = 5 μ m). B1, D1 (Barra = 2 μ m).

Outro estudo, mostrou que a exposição pré-natal de camundongos machos e fêmeas ao TBT, aumentou o peso da maioria dos depósitos de tecido adiposo. Além disso, levou ao acúmulo de lipídios hepáticos e regulou a expressão hepática do armazenamento de lipídios e genes lipogênicos, como o PPAR γ , em três gerações subsequentes. Outro efeito observado nesse trabalho foi uma predisposição a reprogramação de células-tronco mesenquimais de medula óssea em linhagem de adipócitos, (Chamorro-García *et al.* 2013). Essa mesma predisposição também havia sido observada por Kirchner *et al.* (2010). Esse efeito poderia explicar a estrutura

encontrada em nossos animais, uma vez que no ovário se encontram muitas células mesenquimais. Apesar do efeito TBT obesogênico no ovário de mamífero não ser totalmente compreendido, Lee *et al.* (2012) relataram que TBT (1 mg / Kg TBT por 7 dias) foi capaz de modular genes adipogênicos de ovário, levando a uma perda de função ovariana normal em ratas de três semanas de idade.

Fizemos análises da presença lipídica nesses ovários. Na análise do *Oil Red O* é possível observar maior acúmulo lipídico nos animais tratados (CON: $23,29 \pm 2,27$; TBT: $32,46 \pm 2,12$, $p < 0,01$) (Figura 5A e C), fato confirmado na microscopia eletrônica, que apresentou maior presença de gotículas lipídicas no interior das células ovarianas de animais tratados (Figura 5 B, B1, D e D1). Esses dados são reforçados pela dosagem de colesterol ovariano, que se mostrou aumentada nos animais tratados (CON: $111,98 \pm 3,37$; TBT: $112,09 \pm 2,47$, $p < 0,01$) (Figura 5F).

A análise morfométrica uterina demonstrou redução nas áreas de endométrio (CON: $2,76 \pm 0,19$; TBT: $1,41 \pm 0,14$, $p < 0,001$) e Miométrio (CON: $3,25 \pm 0,32$; TBT: $1,55 \pm 0,17$, $p < 0,001$) (Figura 6C e D). Foram observadas células apoptóticas e inflamatórias, dados em consonância com a literatura. Já foi relatado por nosso grupo, atrofia uterina, presença de macrófagos e neutrófilos e maior expressão de mRNA de caspase-3 resultante da exposição a TBT em ratas (Sena *et al.*, 2017). Além disso, Harazono e Ema (2000) relataram diminuição dos pesos uterinos e supressão da resposta das células decíduais uterinas após exposição de ratas pseudo-grávidas a 16,3 mg / Kg de TBT, nos dias 0 a 3 ou 4 a 7 em ratas.

No início da fase folicular, o crescente nível de estrogênio promove aumento da musculatura uterina e proliferação das células do estroma e da camada epitelial. Os estrogênios também possuem efeito no desenvolvimento da camada basal, glândulas endométricas e vasos sanguíneos. Na fase proliferativa, essas glândulas se desenvolvem e passam a secretar muco fino, além de ocorrer aumento na retenção de líquidos e eletrólitos, o que torna o órgão edemaciado nessa fase. O estrogênio é responsável também por induzir a expressão dos receptores de progesterona. Na fase secretora, além do estrogênio que promoverá a continuação do aumento do endométrio, a progesterona passa a ser secretada e estimula o desenvolvimento completo das artérias responsáveis pela irrigação do endométrio. Com a redução dos níveis desses hormônios, o endométrio atrofia (Franci, C.R.; Anselmo-Franci, J., A., 2008, p. 1070)

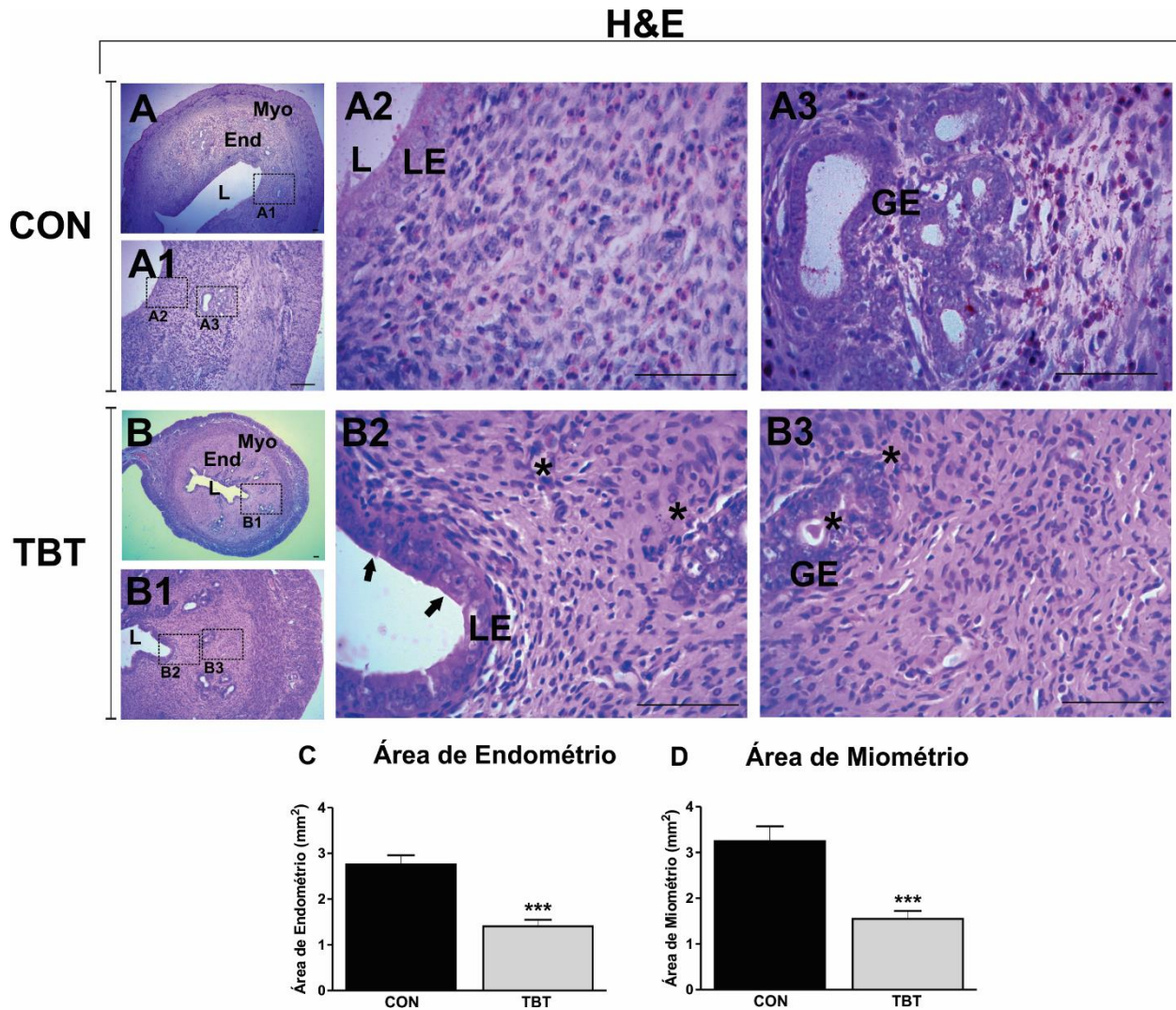


Figura 6: Morfologia uterina nas fêmeas (n = 5). As seções representativas dos (A, A1, A2, A3) CON e (B, B1, B2, B3) TBT útero foram coradas com H & E, foi indicado atrofia, células apoptóticas em LE (seta, B2) e presença de células inflamatórias (asterisco, B2 e B3) no TBT. (A, A1, A2, A3) Os aspectos regulares do endométrio, miométrio e LE e GE foram observados no CON. (C) Área endometrial e (D) miometrial reduzida nos ratos TBT. *** $p < 0.001$ vs. CON (teste t de *Student*). L: lúmen. LE: epitélio luminal. GE: epitélio glandular. End: endométrio. Myo: miométrio. Barra = 100 μ m (A, A1, B, B1). Barra = 50 μ m (A2, A3, B2, B3).

4.3 – Análise Inflamatória

Para a análise de possíveis processos inflamatórios foi utilizada a coloração de *Alcian Blue*, para marcação de mastócitos. Na quantificação de mastócitos no ovário não foi possível observar diferença entre os grupos (Figura 7A, C e E), porém, no útero o número de mastócitos estava aumentado (CON: $0,76 \pm 0,11$; TBT: $2,74 \pm 0,01$, $p < 0,001$) (Figura 7B, D e F).

Nas análises de MPO e NAG apresentaram diferença nos dois órgãos. No ovário os valores de MPO estavam maiores (CON: $0,19 \pm 0,01$; TBT: $0,37 \pm 0,04$, $p < 0,001$ - Figura 7G), indicando maior expressão/atividade de neutrófilos, podendo indicar um início de processo inflamatório. No útero os valores de NAG apresentaram diferença (CON: $0,14 \pm 0,01$; TBT: $0,18 \pm 0,01$, $p < 0,01$ - Figura 7J), indicando maior expressão/atividade de macrófagos, podendo indicar um processo inflamatório em andamento. Sabe-se que NAG é uma enzima lisossomal hidrolítica, predominantemente produzida e liberada por macrófagos ativados (Reiner *et al.*, 1981) enquanto MPO é uma enzima encontrada nos grânulos de neutrófilos (Mullane *et al.*, 1985), ambas são marcadores de inflamação tecidual. Estudos anteriores do nosso grupo, mostraram atividade anormal de MPO e NAG no tecido adrenal, renal e uterino após exposição a 100 ng/ Kg de TBT por 15 dias, sendo associado à disfunção nesses órgãos (Coutinho *et al.*, 2016; Merlo *et al.*, 2016 Sena *et al.*, 2017). Do mesmo modo, Bertuloso *et al.* (2015) relataram aumento de mastócitos no tecido adiposo branco e granuloma hepático de fêmeas expostas ao mesmo tratamento.

Já foi demonstrado que células do sistema imunológico, quando expostas ao TBT, aumentam sua secreção de TNF- α , o que pode prejudicar o recrutamento de células pró-inflamatórias (Hurt *et al.*, 2013). As anormalidades encontradas no trato reprodutivo feminino resultantes da exposição ao TBT, como a inflamação, podem estar associadas ao estresse oxidativo (EO), reparação e remodelação do tecido. Para ocorrer o EO, é necessário que a produção celular de espécies reativas ao oxigênio (ROS) excede a capacidade de eliminação dessas moléculas pelos dos antioxidantes naturais. Nesse quadro, os níveis de ROS podem causar danos em proteínas, lipídeos e DNA, causando disfunção e morte celular (Matés, 2000; Dröge, 2002). Assim, esses dados sugerem que a inflamação do trato reprodutivo, causada pelo TBT, é resultante da adipogênese ovariana anormal em fêmeas adultas. Além disso, trabalhos demonstraram que a inflamação uterina pode prolongar a fase de diestro e alterar o ciclo reprodutivo (Kaneko *et al.*, 2004), como demonstrado na figura 1.

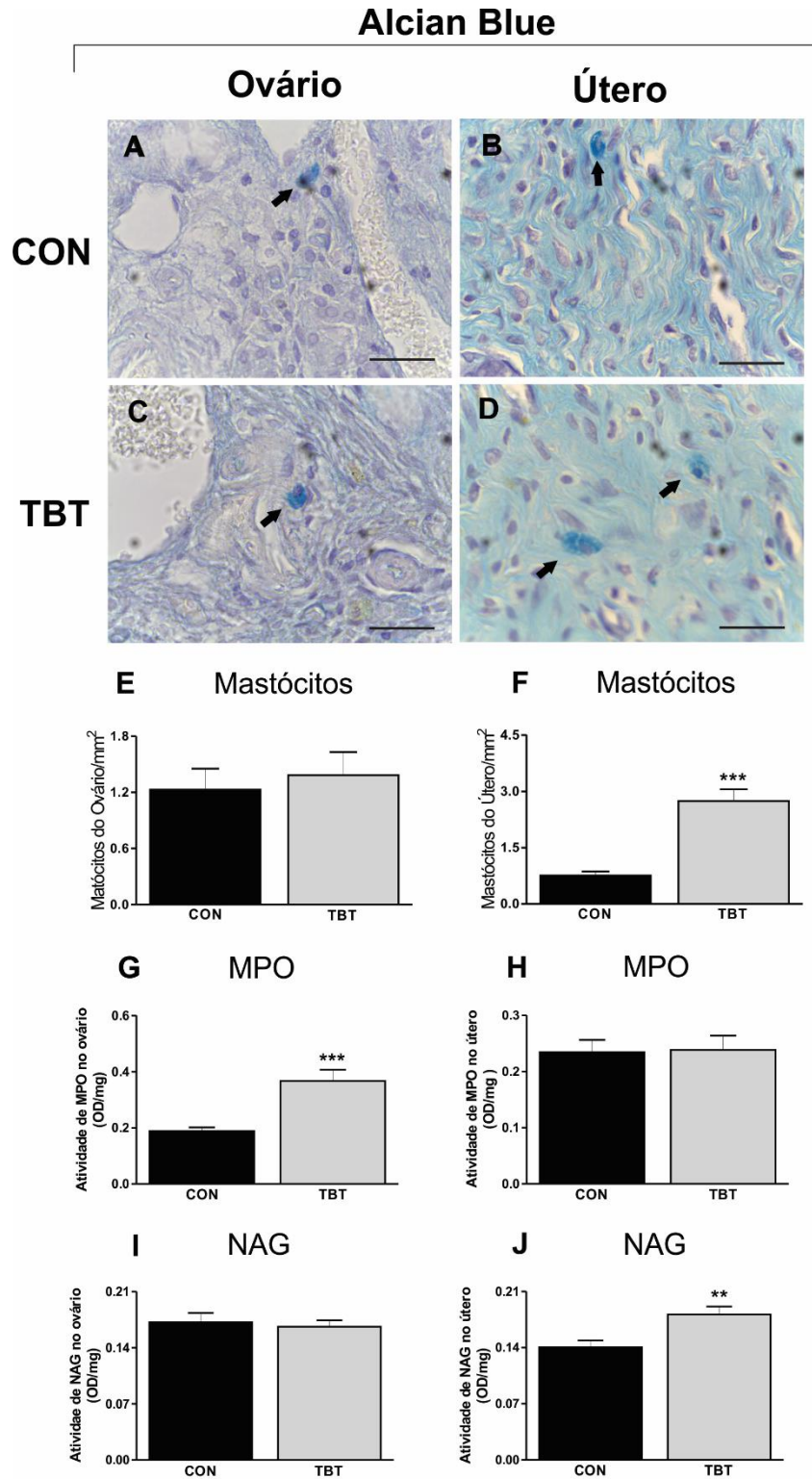


Figura 7: (A) Inflamação no ovário e útero das fêmeas (n = 5). As seções representativas de mastócitos (seta) nos ovários TBT (A) CON e (C) foram coradas com *Alcian Blue*. (E) Não foi observada diferença significativa nos mastócitos nos ovários dos ratos CON e TBT. Seções de representativas de mastócitos de (B) CON e (D) TBT no útero. (F) Aumento dos mastócitos no útero dos ratos TBT. (G) Aumento da atividade MPO no ovário dos ratos TBT. (H) atividade de MPO no útero dos ratos TBT. (I) atividade NAG no ovário dos ratos CON e TBT. (J) Aumento da atividade NAG no útero dos ratos TBT. ** p<0.01, *** p<0.001 vs. CON (teste t de *Student*). NAG: N-Acetil-p-D-Glucosaminidase. MOP: Myeloperoxidase. Barra: 12,5 µm (A-D).

4.4 – Análise do Estresse Oxidativo

Para a análise do estresse oxidativo no ovário e útero usamos a técnica de DHE, em que o tecido emite uma fluorescência vermelha na presença de ânion superóxido. A quantificação dessa fluorescência só apresentou diferença significativa nas amostras de ovário (CON: $9,20 \pm 1,09$; TBT: $16,64 \pm 1,81$, $p < 0,01$) (Figura 8A e C). Além disso, avaliamos também a atividade de glutathione redutase, um tripeptídeo com importante função antioxidante, outra técnica de avaliação de estresse oxidativo, porém não foi observado diferença significativa entre os grupos, tanto para ovário quanto para útero (Figura 8G e H). Como dito anteriormente, essa enzima, possui importante papel na biotransformação e eliminação de xenobióticos, além de atuar na defesa das células contra o estresse oxidativo (Joseph *et al.*, 1997).

O TBT está associado a disfunções metabólicas, reprodutivas, renais, adrenais e neurais (Grün *et al.*, 2006; Grote *et al.*, 2009; Mitra *et al.*, 2013). Embora o mecanismo exato de como TBT induz essas anormalidades permaneça desconhecido, a toxicidade TBT é atribuída à sua capacidade de aumentar o EO celular em diferentes modelos. Mitra *et al.* (2013), relataram aumento do EO com declínio acentuado no estado antioxidante do córtex cerebral 7 dias após uma única dose de TBT (30 mg/Kg). Mitra *et al.* (2014) e Coutinho *et al.* (2016) demonstraram aumento do desenvolvimento do estresse oxidativo no rim de ratos exposto a 1 mg/Kg TBT por 30 dias e 100 e 500 ng/Kg TBT por 15 dias, respectivamente. Esse aumento no estresse oxidativo está associado a anormalidades do trato reprodutivo em fêmeas (Rossi *et al.*, 2016).

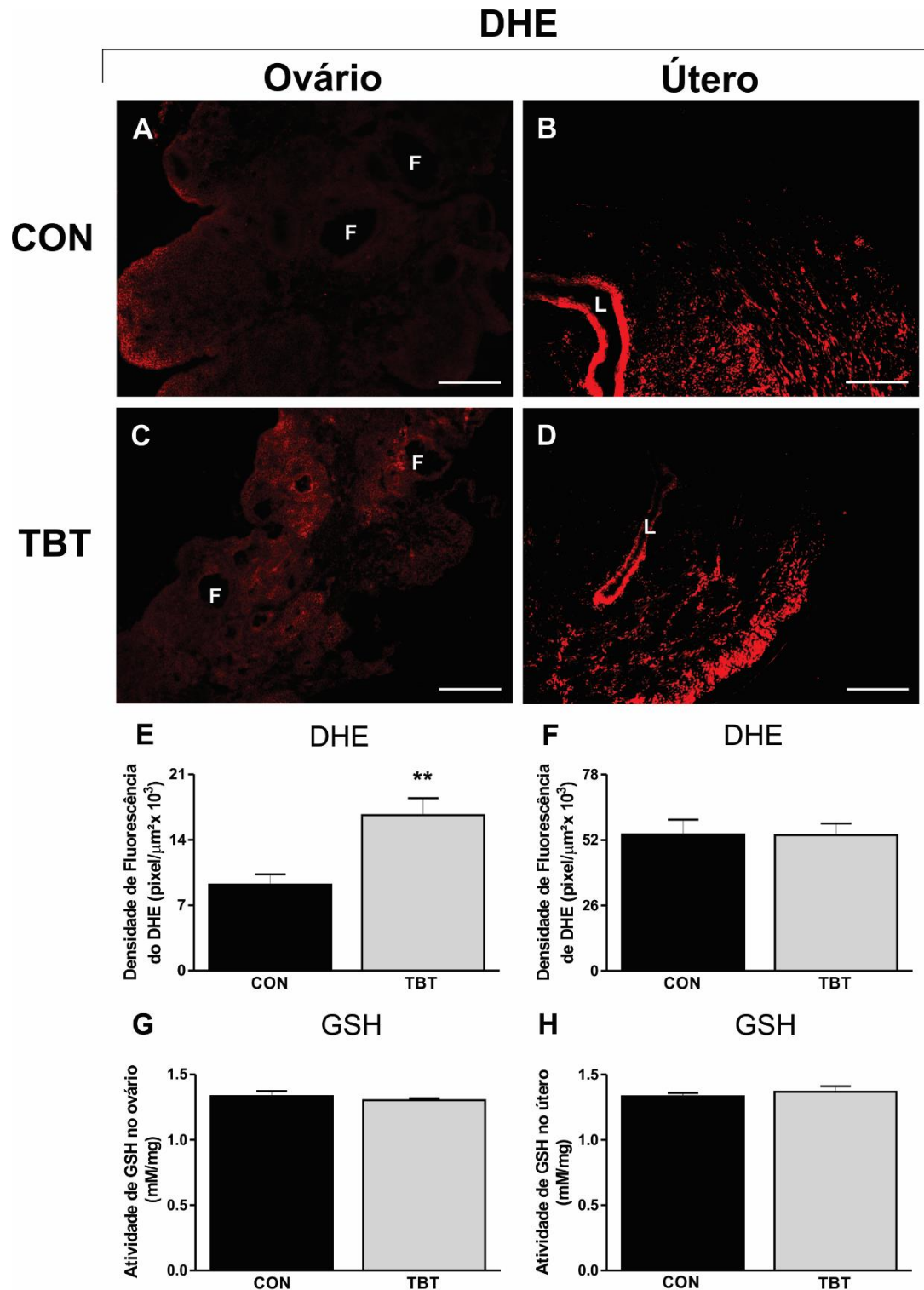


Figura 8: Detecção *in situ* da produção de anions superóxido (O_2^-) e atividade GSH no ovário e útero dos ratos CON e TBT ($n = 5$). As micrografias fluorescentes da coloração com o corante sensível a O_2^- (fluorescência vermelha) foram obtidas a partir dos ovários (A) CON e (C) TBT, e dos úteros (B) CON e (D) TBT. (E) Aumento da produção de O_2^- observado nos ovários TBT. (F) A produção de O_2^- foi observada no útero de CON e TBT. (G e H) atividade de GSH nos ovários e úteros dos ratos CON e TBT. ** $p < 0.01$ vs. CON (teste t de Student). F: folículo ovariano. L: lúmen uterino. Barra: 60 μm (A-D).

4.5 – Análise da Deposição de Colágeno

Na análise do colágeno, foi usada a técnica de *Picro Sirius Red* para corar ovários e úteros. Encontramos maior deposição de colágeno nos grupos tratados, tanto em ovário (CON: $2,10 \pm 0,09$; TBT: $2,42 \pm 0,10$, $p < 0,05$) (Figura 9A, C e E) quanto em útero (CON: $3,90 \pm 0,12$; TBT: $4,23 \pm 0,09$, $p < 0,05$) (Figura 9B, D e F). Nossos estudos anteriores mostram fibrose anormal do trato reprodutivo de ratas submetidas ao tratamento com TBT (Sena *et al.*, 2017). Da mesma forma, outras pesquisas relatam aumento da deposição de colágeno após a exposição ao TBT no tecido adrenal e renal de fêmeas (Coutinho *et al.*, 2016, Merlo *et al.*, 2016). É sabido que ratas tratadas com dehidroepiandrosterona (DHEA) por 35 dias, apresentam diminuição dos níveis séricos de estrogênio, hiperandrogenismo e fibrose no ovário e útero (Zhang *et al.*, 2013). Assim, é possível inferir que o desbalanço entre os níveis de andrógenos e estrógenos acarretaria na maior deposição de colágeno nos órgãos analisados.

4.6 – Análise da Correlação entre os marcadores adipogênicos ováricos, esteroidogênese, inflamação do trato reprodutivo e estresse oxidativo.

A análise de correlação entre os diferentes parâmetros foi realizada, um ajuste linear ou não linear foi traçado quando apropriado (Figura 10). Os níveis de colesterol do ovário, a expressão da proteína PPAR γ , a expressão de mRNA de C/EBP- β , a expressão de mRNA de Lipina-1, a expressão da proteína CYP11A1, a expressão de mRNA de aromatase, a inflamação, o estresse oxidativo e os dados de inflamação uterina exibiram uma distribuição gaussiana e testes de correlação paramétrica da Pearson foram realizados quando esses parâmetros foram analisados (teste de normalidade de D'Agostino & Pearson, $p > 0,10$, $p > 0,10$, $p > 0,10$, $p > 0,10$, $p > 0,10$, $p > 0,10$, $p > 0,10$, $p > 0,10$ e $p > 0,10$, respectivamente, $n = 9-15$). Não foi observada correlação significativa com uma associação linear entre os níveis de colesterol do ovário (Pearson r : -0,11; $p = 0,77$, Figura 10A), expressão da proteína PPAR γ (Pearson r : 0,29; $p = 0,47$; Figura 10B) ou C / EBP - expressão de mRNA (Pearson r : -0,53; $p = 0,14$, Figura 10C) com expressão da proteína CYP11A1 no ovário. No entanto, observou-se uma correlação positiva significativa com uma associação linear entre a expressão de mRNA de Lipina-1 de ovário e a expressão da proteína CYP11A1 (Pearson $r = 0,89$; $p = 0,002$, Figura 10D).

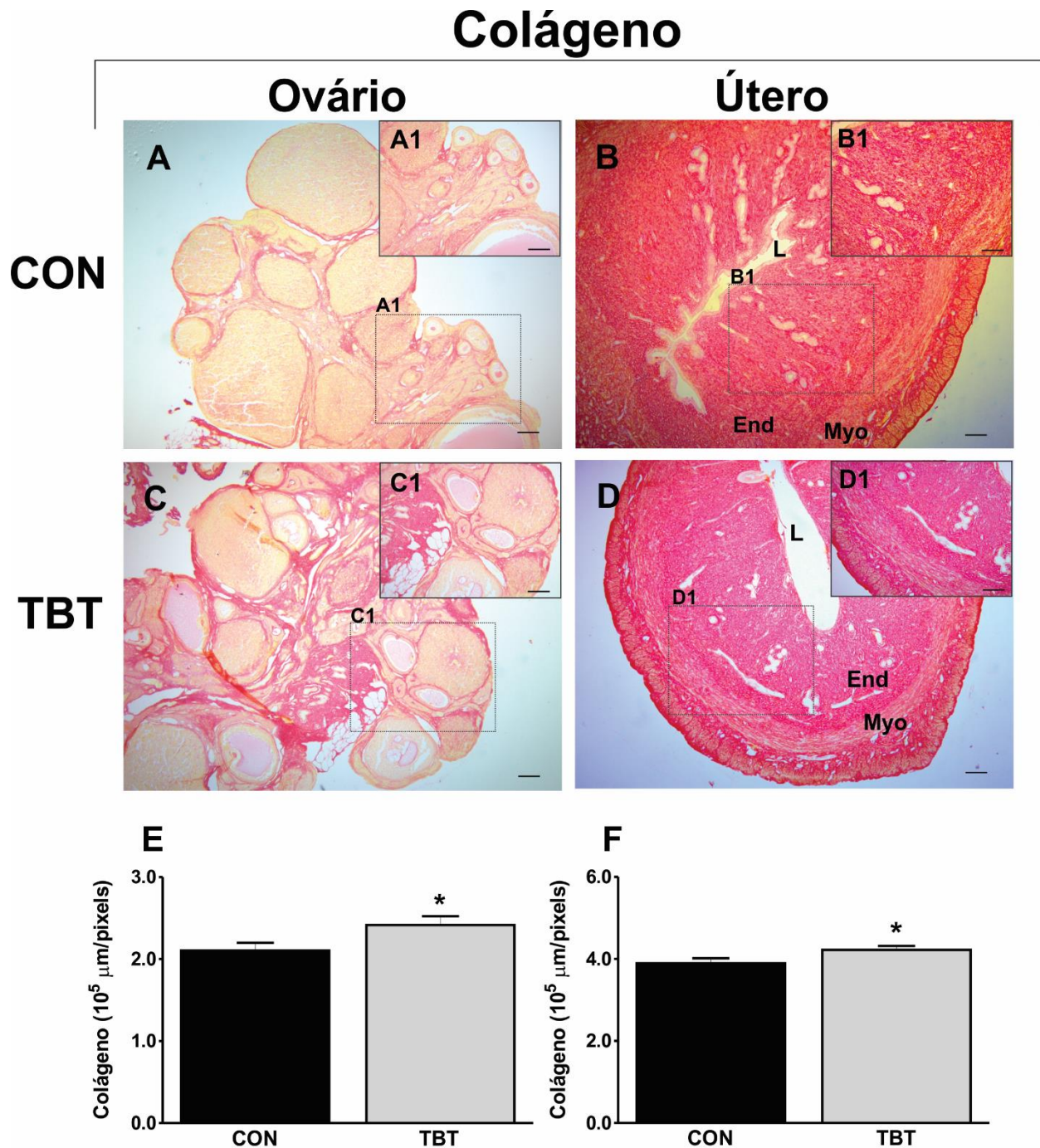
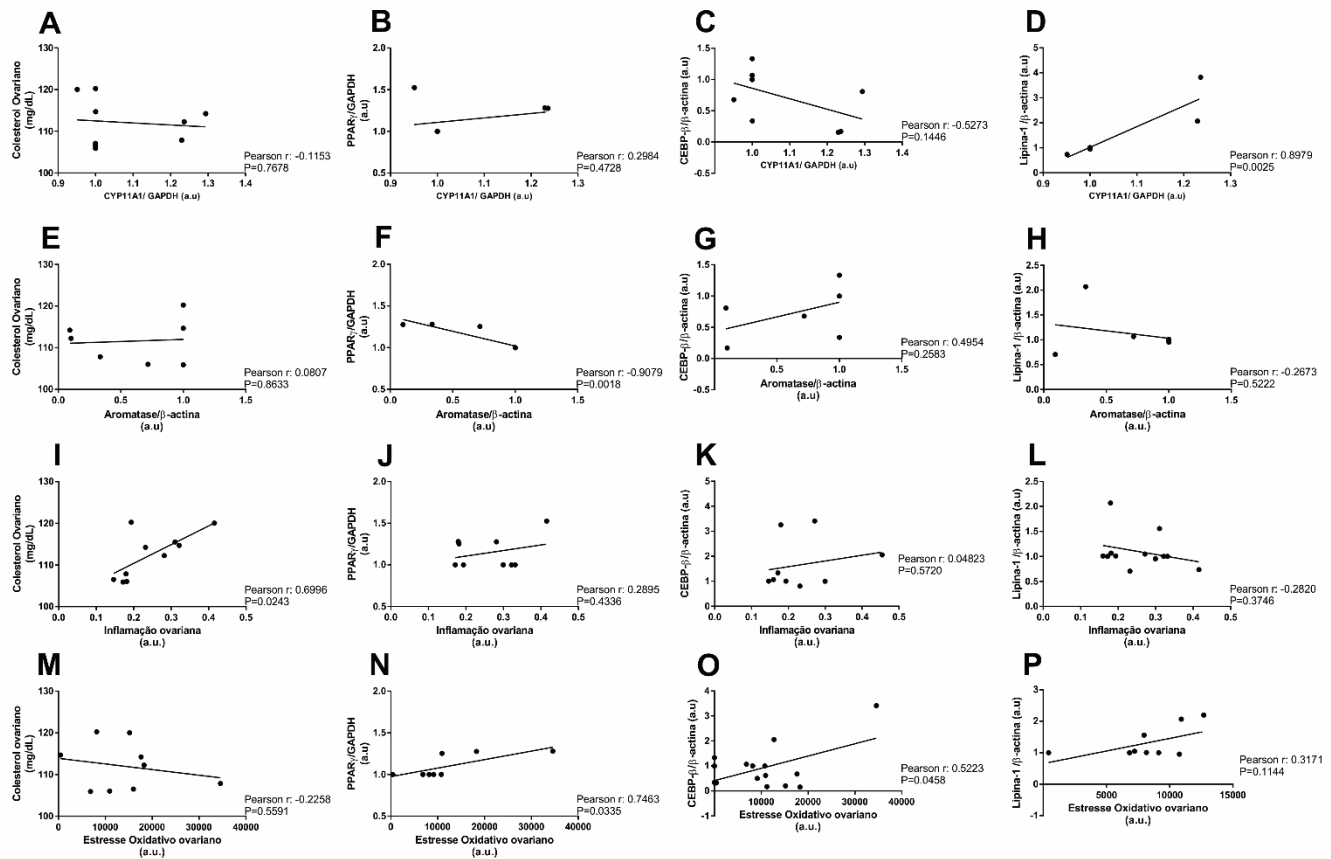


Figura 9: Depósito de colágeno no ovário e útero das fêmeas. Seções representativas de colágeno nos ovários (A, A1) CON e (C, C1) TBT, e nos úteros (B, B1) CON e (D, D1) TBT corados com *Picro-sirius Red* (n = 5). (E, F) Aumento da deposição de colágeno nos ovários e úteros TBT. * p<0.05 vs. CON (teste t de *Student*). Barra = 100 μm (A-D). Barra = 50 μm (A1, B1, C1 e D1). L: lúmen uterino. End: endométrio. Myo: miométrio.

Não foi observada correlação significativa com uma associação linear entre os níveis de colesterol do ovário e a expressão da mRNA da aromatase (Pearson r : 0,08; p = 0,86, Figura 10E). No entanto, observou-se uma correlação negativa significativa com uma associação linear entre a expressão da proteína PPAR γ do ovário e a expressão da mRNA da aromatase (Pearson r = -0,90; p = 0,002, Figura 10F). Não foi observada correlação significativa com uma associação linear entre a expressão de mRNA de C/EBP- β do ovário (Pearson r : 0,49; p = 0,26, Figura 10G) e a expressão de mRNA de Lipina-1 com a expressão de mRNA de aromatase (Pearson r : -0,26 p = 0,52, Figura 10H). Além disso, observou-se uma correlação positiva significativa com uma associação linear entre os níveis de colesterol do ovário e a inflamação (Pearson r = 0,69; p = 0,02, Figura 10I). Não foi observada correlação significativa com uma associação linear entre a expressão e a inflamação da proteína PPAR γ do ovário (Pearson r = 0,29; p = 0,43, Figura 10J). Não foi observada correlação significativa com uma associação linear entre a expressão de mRNA de C/EBP- β do ovário e a inflamação (Pearson r = 0,05; p = 0,57, Figura 10K). Não foi observada correlação significativa com uma associação linear entre a expressão e a inflamação do mRNA da Lipina-1 no ovário (Pearson r = -0,28; p = 0,37, Figura 10L). Não foi observada correlação significativa com uma associação linear entre os níveis de colesterol do ovário com estresse oxidativo (Pearson r : -0,22; p = 0,56, Figura 10M). Observou-se uma correlação positiva significativa com uma associação linear entre a expressão da proteína PPAR γ do ovário (Pearson r = 0,75; p = 0,03, Figura 910) e a expressão de mRNA de C / EBP- β (Pearson r = 0,52; p = 0,04, Figura 10O) com estresse oxidativo do ovário. Não foi observada correlação significativa com uma associação linear entre a expressão de mRNA de Lipina-1 de ovário e o estresse oxidativo (Pearson r = 0,32; p = 0,11, Figura 10P). Além disso, observou-se uma correlação positiva significativa com uma associação linear entre os níveis de colesterol do ovário (Pearson r = 0,76; p = 0,01, Figura 10Q) e a expressão da proteína PPAR γ com inflamação uterina (Pearson r = 0,72; p = 0,04, Figura 10R). Não foi observada correlação significativa com uma associação linear entre a expressão de mRNA de C/EBP- β do ovário (Pearson r = -0,14; p = 0,60, Figura 10S) e a expressão de mRNA de Lipina-1 com inflamação uterina (Pearson r = -0,03; p = 0,92, Figura 10T).

Correlações - Ovário



Correlações - Útero

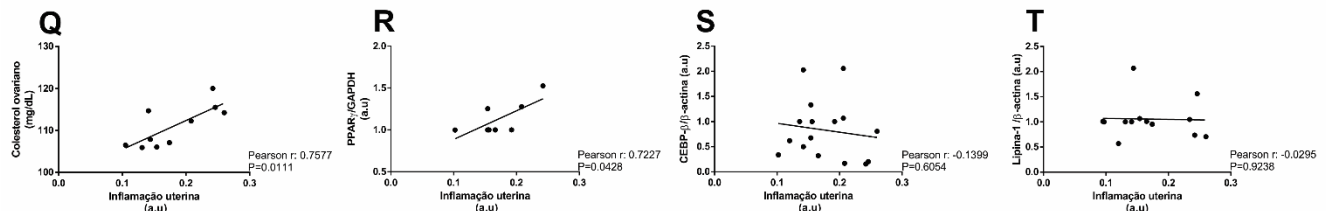


Figura 10: A correlação entre os marcadores adipogênicos ovarianos, esteroidogênese, inflamação do trato reprodutivo e estresse oxidativo. Os valores da expressão de CYP11A1 foram traçados em conjunto com (A) os níveis de colesterol no ovário, (B) expressão de PPAR γ , (C) expressão de C/EBP- β e (D) expressão de Lipin-1. A expressão da aromatase foi correlacionada com (E) níveis de colesterol no ovário, (F) expressão de PPAR γ , (G) expressão de C/EBP- β e (H) expressão de Lipin-1. Os valores para a inflamação do ovário foram correlacionados com (I) os níveis de colesterol de ovário, (J) expressão de PPAR γ , (K) expressão de C/EBP- β e (L) expressão de Lipin-1. Os dados do estresse oxidativo do ovário foram plotados com (M) os níveis de colesterol do ovário, (N) expressão de PPAR γ , (O) expressão de C/EBP- β e (P) expressão de Lipin-1. A inflamação uterina foi analisada e correlacionada com alguns parâmetros dos ovários. Por esta razão, os valores para a inflamação uterina foram traçados com (Q) os níveis de colesterol no ovário, (R) expressão de PPAR γ , (S) expressão de C/EBP- β e (T) expressão de Lipin-1. O significado estatístico ($p < 0,05$) foi testado usando o teste de Spearman ou Pearson se fosse detectada uma distribuição de dados não gaussiana ou gaussiana, respectivamente.

Resumidamente, é possível correlacionar os marcadores adipogênicos com os prejuízos a esteroidogênese, aumento da inflamação ovariana e uterina, bem como aumento de EO no ovário. Além disso, o aumento do nível de colesterol ovariano possui correlação com a inflamação encontrada no ovário e útero dos animais tratados. Sendo assim, é possível inferir que o caráter obesogênico do TBT está diretamente relacionado aos problemas reportados ao longo do estudo, sendo a possível causa deles.

5 – Conclusão

Como demonstrado, a exposição ao TBT foi responsável por alterações morfofuncionais no trato reprodutivo de ratas adultas. O TBT induziu a prejuízos na via esteroidegênica ovariana desses animais, tendo como consequência um desbalanço nos níveis dos hormônios sexuais, bem como um padrão anormal de ciclo estral, com aumento da fase de M-D. Na análise microscópica do ovário, identificamos alterações na maturação dos folículos, além de estrutura semelhante a adipócitos. Associado a isso, encontramos maior expressão gênica de C/EBP- β e lipina-1, além de maior expressão proteica de PPAR γ , juntamente com acúmulo de colesterol no grupo tratado. Observamos também, a presença de células inflamatórias, indicando inflamação ovariana, dado que foi reforçado pelo teste de MPO, que estava aumentado no grupo TBT. Consequentemente, encontramos maior nível de estresse oxidativo e deposição de colágeno nos ovários de animais tratados.

Na análise uterina, observamos reduções nas áreas de endométrio e miométrio. Além da presença de maior número de mastócitos nos úteros dos animais tratados, indicando inflamação. Esse dado é corroborado pelo teste de NAG, também aumentado no grupo TBT. Não observamos diferença nos níveis de estresse oxidativo, porém a deposição de colágeno estava aumentada nos úteros dos animais tratados.

Em conclusão, nosso modelo demonstra que a função anormal do ovário é atribuível aos efeitos disruptivos e obesogênicos do TBT na via de sinalização PPAR γ , C/EBP- β e Lipin-1 que controlam a adipogênese no ovário do sexo feminino adulto. O TBT induziu ciclicidade estral e esteroideogênese de hormônios sexuais ovarianos anormais, podendo estar associada à irregularidade desenvolvimento folicular ovariano. A presença de tecido adiposo anormal e o acúmulo de lipídios no ovário, foram associados ao aumento da expressão de PPAR γ , C/EBP- β e Lipina-1. Além disso, hiperandrogenismo, inflamação, apoptose e fibrose estavam presentes no trato reprodutivo das ratas TBT. Este estudo aumenta a nossa compreensão dos efeitos TBT obesogênicos no trato reprodutivo devido à regulação anormal adipogênica do ovário em mulheres adultas.

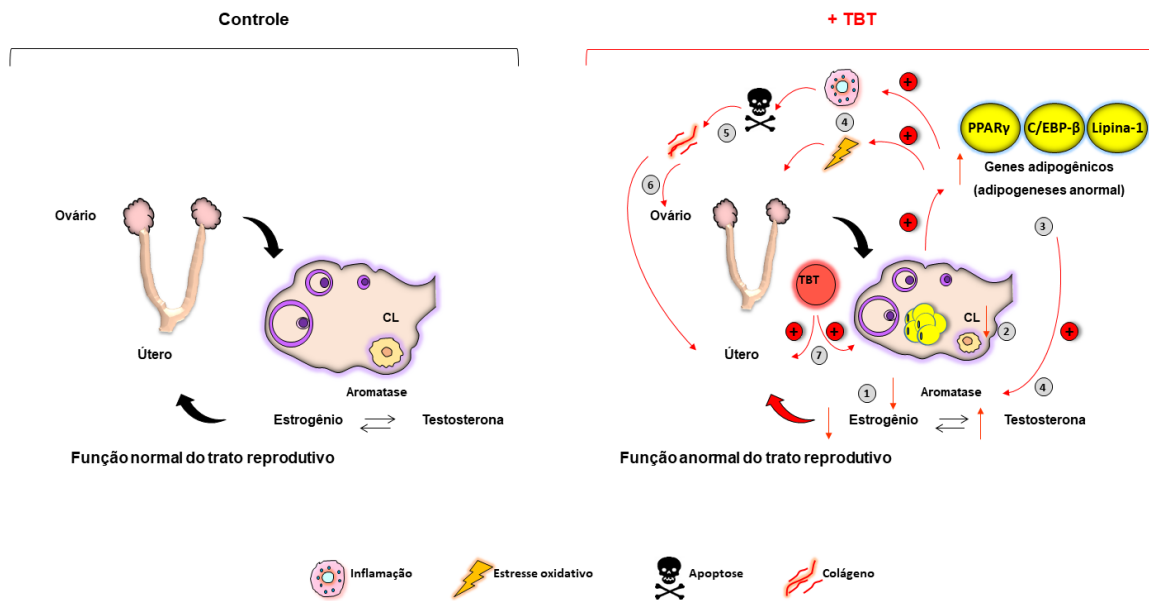


Figura 11: Um modelo do potencial mecanismo de modulação obesogênica no trato reprodutivo feminino adulto. O TBT leva a irregularidades do trato reprodutivo (linha vermelha), tais como: (1) redução da expressão de mRNA da aromatase e comprometimento na esteroidogênese ovariana, (2) esteroidogênese anormal possivelmente associada a comprometimento do desenvolvimento folicular ovariano e formação de corpo lúteo (CL), (3) adipogênese ovariana anormal devido à aumento de genes adipogênicos, (4) adipogênese ovariana anormal possivelmente associada a esteroidogênese irregular, (5) inflamação do trato reprodutivo e estresse oxidativo, (6) apoptose e deposição de colágeno no trato reprodutivo e (7) adipogênese anormal direta e / ou irregularidades indiretas do trato reprodutivo.

6 – Referências

1. Ahn R.S.; Han S.J.; Kim S.C.; Kwon H.B. Effects of butyltin compounds on follicular steroidogenesis in the bullfrog (*Rana catesbeiana*). **Environmental Toxicology Pharmacology**. 24:149-154. 2007.
2. Alzieu, C. Tributyltin case study of a chronic contaminant in the coastal environment. **Ocean & coastal management**, v. 40, p. 23–36, 1998.
3. Araujo, F.A.; Rocha, M.A.; Mendes, J.B.; Andrade, S.P. Atorvastatin inhibits inflammatory angiogenesis in mice through down regulation of VEGF, TNF-alpha and TGF-beta1. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. 64:29–34. 2010
4. Barcelos, L.S., Talvani, A., Teixeira, A.S., Vieira, L.Q., Cassali, G.D., Andrade, S.P., Teixeira, M.M. Impaired inflammatory angiogenesis, but not leukocyte influx, in mice lacking TNFR1.. 78:352–358. 2005.
5. Bertuloso, D.B.; Podratz, P.L.; Merlo, E.; de Araújo, J.F.P.; Lima, L.C.F.; de Miguel, E.C.; de Souza, L.N.; Gava, A.L.; de Oliveira, M.; Miranda-Alves, L.; Carneiro, M.T.W.D.; Nogueira, C.R.; Graceli, J.B. Tributyltin Chloride leads to adiposity and impairs metabolic functions in the rat liver and pancreas. **Toxicology Letters**., v. 235(1), p. 45-59, 2015.
6. Bianchi, F. J.; Tanno, A. P.; Marcondes, F. K. Relação entre nível de estresse e supersensibilidade à norepinefrina em ratas no proestro. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, p. 391–398, 2001.
7. Bila, D. M.; Dezotti, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química Nova**, v. 30, n. 3, 2007.
8. Blunden, S. J.; Evans, C. J. Organotin compounds In: Hutzinger, O (Ed) **The Handbook of Environmental Chemistry**. Berlim:Springer-Verlog, v.3, p.1-44, 1990.
9. Borgeest, C., Symonds, D., Mayer, L.P., Hoyer, P.B., Flaws, J.A. Methoxychlor may cause ovarian follicular atresia and proliferation of the ovarian epithelium in the mouse. **Toxicological. Sciences**. 68:473–478, 2002.
10. Brown, R. P.; Greer, R. D.; Mihaich, E. M.; Guiney, P. D. A critical review of the scientific literature on potential endocrine-mediated effects in fish and wildlife. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 49, p. 17-25. 2001.
11. Casals-Casas, C.; Desvergne, B. Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. **Annual review of physiology**, v. 73, p. 135–162. 2011.

12. Chamorro-García, R., Sahu, M., Abbey, R.J., Laude, J., Pham, N., Blumberg, B. Transgenerational inheritance of increased fat depot size, stem cell reprogramming, and hepatic steatosis elicited by prenatal obesogen tributyltin in mice. **Environmental Health Perspective**. 121, 359–366. 2013.
13. Chien, L. C.; Hung, T.C.; Chaoang, K. Y. Daily intake of TBT, Cu, Zn, Cd e As, for fishrmen in Taiwan. **Science of the Total Environmental**, v. 285, p. 117-185, 2002.
14. Colborn, T.; Vom Saal, F. S.; Soto, A. M. Developmental effects of endocrine disrupting chemicals in wildlife and humans. **Environmental health perspectives**, v. 101, p. 378–84, 1993.
15. Cooke, G.M.; Forsyth, D.S.; Bondy, G.S.; Tachon, R.; Tague, B.; Coady, L. Organotin Speciation and Tissue Distribution in Rat Dams, Fetuses, and Neonates Following Oral Administration of Tributyltin Chloride. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues**, 71:6, 384-395. 2008
16. Couse JF, Lindzey J, Grandien K, Gustafsson J-åke, Korach KS. Tissue Distribution and Quantitative Analysis of Estrogen Receptor- α (ER α) and Estrogen Receptor- β (ER β) Messenger Ribonucleic Acid in the Wild-Type and ER α -Knockout Mouse. **Endocrinology** 138:4613–4621. 1997.
17. Coutinho JV, Freitas-Lima LC, Freitas FF, Freitas FP, Podratz PL, Magnago RP, Porto ML, Meyrelles SS, Vasquez EC, Brandão PA, Carneiro MT, Paiva-Melo FD, Miranda-Alves L, Silva IV, Gava AL, Graceli JB. Tributyltin chloride induces renal dysfunction by inflammation and oxidative stress in female rats. **Toxicology Letters**, 17;260:52-69. 2016
18. Delgado Filho, V. S.; Lopes, P. F.; Podratz, P. L.; Gracelli, J. B. Triorganotin as a compound with potential reproductive toxicity in mammals. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, p. 958–965, 2011.
19. DRÖGE, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. **Physiological Reviews**, n. 82, p. 48-95, 2002.
20. Dupont S, Krust A, Gansmuller A, Dierich A, Chambon P, Mark M. Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes. **Development** 127: 4277–4291. 2000.
21. Ema M, Harazono A. The Adverse effects of dibutyltin dichloride on initiation and

- maintenance of rat pregnancy. **Reproductive Toxicology**, 14:451–456. 2000.
22. Ema, M.; Kurosaka, R.; Amano, H.; Ogawa, Y. Further evaluation of the development toxicity of tributyltin chloride in rats. **Toxicology**, v, 96, p. 195-201. 1995.
 23. Ema, M.; Miyawaki, E. Suppression of uterine decidualization correlated with reduction in serum progesterone levels as a cause of preimplantation embryonic loss induced by diphenyltin in rats. **Reproductive toxicology**, v. 16, p. 309–317, 2002.
 24. Fent, K. Ecotoxicology of organotin compounds. **Critical Reviews in Toxicology**. 26:1-117, 1996.
 25. Fields, M.J.; Fields, P.A. Morphological characteristics of the bovine corpus luteum during the estrous cycle and pregnancy. **Theriogenology**, v.45, p.1295-1325. 1996
 26. Filardo EJ, Quinn JA, Frackelton Jr AR, Bland KI. Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. **Molecular Endocrinology**, 16: 70–84. 2002.
 27. Filicore, M., Merriam, G.R., Crowley, W.F.Jr. Characterization of the physiological pattern of episodic gonadotropin secretion throughout the human menstrual cycle. **Journal Clinical Endocrinology Metabolism**. 62:1136-1144, 1986.
 28. Franci, C.R.; Anselmo-Franci, J., A. Sistema reprodutor feminino. In: Aires, Margarida de Mello. **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
 29. Freeman, M. E. The ovarian cycle of the rat. E. KNOBIL and J. NEIL. (eds). In: **Physiology of reproduction**, New York: Raven Press Ltd, p. 1893-1928, 1988.
 30. Gadd, G. M. Microbial interactions with tributyltin compounds: detoxification, accumulation, and environmental fate. **The Science of the Total Environment**, v. 258, p. 119-127, 2000.
 31. Godoi, A. F. L.; Favoreto, R.; Santiago-Silva, M. Environmental contamination for organotin compounds. **Química Nova**, v. 26, p. 708-716, 2003.
 32. Goldman, J.M.; Murr, A.S.; Cooper, R.L. The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and Its Utility in Toxicological Studies. **Birth Defects Research (Part B)** 80:84–97. 2007.

33. Graceli, J. B.; Sena, G. C.; Lopes, P. F.; Zamprogno, G. C.; da Costa, M. B.; Godoi, A. F.; dos Santos, D. M.; de Marchi, M.R; dos Santos Fernandez, M. A. Organotins: A review of their reproductive toxicity, biochemistry, and environmental fate. **Reproductive Toxicology**, v. 36, p. 40-52, 2013.
34. Gore AC. Endocrine-Disrupting Chemicals. **JAMA Internal Medicine** 176:1705. 2016.
35. Grote, K.; Stahlschmidt, B.; Talsness, C. E.; Gericke, C.; Appel, K. E.; Chahoud, I. Effects of organotin compounds on pubertal male rats. **Toxicology**, v. 202, p.145–158, 2004.
36. Grote, K., Andrade, A.J.M., Wichert, G.S., Kuriyama, S.N., Talsness, C.E., Appel, K.E., Chahoud, I. Effects of peripubertal exposure to triphenyltin on female sexual development of the rat. **Toxicology** 222:17-24, 2006.
37. Grote K, Hobler C, Andrade AJM, Grande SW, Gericke C, Talsness CE, *et al.* 2009. Sex differences in effects on sexual development in rat offspring after pre- and postnatal exposure to triphenyltin chloride. **Toxicology** 260:53–59;
38. Grün, F.; Blumberg, B. Environmental obesogens: organotins and endocrine disruption via nuclear receptor signaling. **Endocrinology**, v. 147, p. S50–S55, 2006.
39. Grün F and, Blumberg B. Endocrine disrupters as obesogens. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 304:19–29. 2009.
40. Guerra, M. T.; Scarano, W. R.; de Toledo, F. C.; Franci, J. A.; Kempinas, W. DE G. Reproductive development and function of female rats exposed to di-*n*-butylphthalate (DBP) *in utero* and during lactation. **Reproductive toxicology**, v. 29, p. 99–105, 2010.
41. Guraya, S. S. Histochemical observations on the interstitial glands cells of dogfish ovary. **General and Comparative Endocrinology**, 18, 409. 1972^a.
42. Gustafsson, J. A. What pharmacologists can learn from recent advances in estrogen signaling. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 24, p.479 –485, 2003.
43. Heindel JJ. 2003. Endocrine disruptors and the obesity epidemic. **Toxicological Sciences**, 76, 247–249 76:247–249. 2003.
44. Hickey TE, Marrocco DL, Amato F, Ritter LJ, Norman RJ, Gilchrist RB, Armstrong DT. Androgens augment the mitogenic effects of oocyte-secreted

- factors and growth differentiation factor-9 on porcine granulosa cells. **Biology of Reproduction**, v.73, p.825-832, 2005
- 45.Hoch M. Organotin compounds in the environment - an overview. **Applied geochemistry**, v. 16, p. 719–743, 2001.
- 46.Hurt, K. Hurd-Brown, T.; Whalen, M. Tributyltin and dibutyltin alter secretion of tumor necrosis factor alpha from human natural killer cells and a mixture of T cells and natural killer cells. **Journal of Applied Toxicology**, v. 33, n. 6, p. 503-510, 2013.
- 47.IMO. **Sistemas anti-incrustantes: hacia una solucion no tóxica** [on line]. London: International Maritime Organization. 1999. Disponível em: <http://www.imo.org/blast/blastDataHelper.asp?data_id=2319&filename=Antifoulingspanish.pdf> Acessado em: 01 de agosto de 2015.
- 48.Jordao, R., Casas, J., Fabrias, G., Campos, B., Pina, B., Lemos, M.F. Obesogens beyond vertebrates: lipid perturbation by tributyltin in the crustacean *Daphnia magna*. **Environmental Health Perspectives**, 123, 813–819. 2015
- 49.Joseph, P. D.; Mannervik, B.; Ortiz de Montellano, P.; **Molecular Toxicology**, 1st ed., Oxford University Press: New York, p.152-186. 1997.
- 50.Kishta, O., Adeeko, A., Li, D., Luu, T., Brawer, J.R., Morales, C., Hermo, L., Robaire, B., Hales, B.F., Barthelemy, J., Cyr, D.G., Trasler, J.M. In utero exposure to tributyltin chloride differentially alters male and female fetal gonad morphology and gene expression profiles in the Sprague-Dawley rat. **Reproductive Toxicology**. 23(1), 1-11, 2007.
- 51.Kaneko, K. *et al.* Influence of Uterine Inflammation on the Estrous Cycle on Rats. **Journal of Reproduction and Development**, v. 50, n. 3, p. 361-367, 2004.
- 52.Kannan, K.; Tanabe, S.; Iwata, H.; Tatsukawa, R. Butyltins in muscle and liver of fish collected from certain Asian and Oceanian countries. **Environmental pollution**, v. 90, p. 279-290, 1995.
- 53.Knecht.M., Feng.P. and Catt.K. Bifunctional role of transforming growth factor- β during granulosa cell development. **Endocrinology**, 120, 1243-1249. 1987.
- 54.Kovalchuck, O.; Kovalchuck, I.; Arkipov, A.; Telyuk, P.; Hohn, B.; Kovalchuck, L. The *Allium cepa* chromosome aberration test realibly measures genotoxicity of soils of inhabited areas in Ukraine contaminated by the Chernobyl accident. **Mutation Research**, v. 415, p. 47-57, 1998.

55. Kuiper, G. G. J. M.; Enmark, E.; Peltö-Huikko, M.; Nilsson, S.; Gustafsson, J. A. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 5430-5925, 1996.
56. Langston, W.J.; Pope, N.D. Determinants of TBT Adsorption and Desorption in Estuarine Sediments. **Marine Pollution Bulletin**. v.31, n1-3, p.32-43, 1995.
57. Lee H, Lim S, Yun S, Yoon A, Park G, Yang H. Tributyltin increases the expression of apoptosis- and adipogenesis-related genes in rat ovaries. **Clinical and Experimental Reproductive Medicine**. Mar;39(1):15-21. 2012.
58. Lemale, J.; Bloch-Faure, M.; Grimont, A.; El Abida, B.; Imbert-Teboul, M.; Crambert, G. Membrane progestin receptors alpha and gamma in renal epithelium. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1783, p. 2234-40, 2008.
59. Lisboa, P. C.; Curty, F. H.; Moreira, R. M.; Oliveira, K. J.; Pazos-Moura, C. C. Sex steroids modulate rat anterior pituitary and liver iodothyronine deiodinase activities. **Hormone and metabolic research**, v. 33, p. 532–535, 2001.
60. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods** 25:402–408. 2001.
61. Lo, S.; Allera, A.; Albers, P.; Heimbrecht, J.; Jantzen, E.; Klingmüller, D.; *et al.* Dithioerythritol (DTE) prevents inhibitory effects of triphenyltin (TPT) on the key enzymes of the human sex steroid hormone metabolism. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 84, p. 569-576, 2003.
62. Luijten, J. G. A. Applications and Biological Effects of Organotin Compounds. IN: Sawyer, A. K., (ed). Organotin Compounds. **New York: Dekker**, v.3, p.931-974, 1987.
63. Lyssimachou, A., Santos, J.G., André, A., Soares, J., Lima, D., Guimarães, L., *et al.* The mammalian “obesogen” tributyltin targets hepatic triglyceride accumulation and the transcriptional regulation of lipid metabolism in the liver and brain of zebrafish. **PLoS One** 10, e0143911. 2015.
64. Magiakou, M. A.; Mastorakos, G.; Webster, E.; Chrousos, G. P. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 17, p. 42-56, 1997.

65. Marcondes, F.K., Bianchi, E.J., Tanno, A.P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal Biology**. 62:609-614, 2002.
66. MATÉS, M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, n. 153, p. 83-104, 2000.
67. Matthiessen, P.; Waldock, R.; Thain, J. E.; Waite, M. E.; Scrope-Howe, S. Changes in periwinkle (*Littorina littorea*) populations following the ban on TBT-based antifoulings on small boats in the United Kingdom. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 30, p. 180–194, 1995.
68. Matthiessen, P., and Gibbs, P.E. Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. **Environmental Toxicology and Chemistry**. 17(1):37-43, 1998.
69. Merlo E, Podratz PL, Sena GC, De Araújo JFP, Lima LCF, Alves ISS, *et al.* The environmental pollutant tributyltin chloride disrupts the hypothalamic-pituitary-adrenal axis at different levels in female rats. **Endocrinology** 157:2978–2995. 2016.
70. Mitra S, Gera R, Siddiqui WA, Khandelwal S. Tributyltin induces oxidative damage, inflammation and apoptosis via disturbance in blood-brain barrier and metal homeostasis in cerebral cortex of rat brain: An in vivo and in vitro study. **Toxicology**, 310:39–52. 2013.
71. Mitra S, Gera R, Singh V, Khandelwal S. Comparative toxicity of low dose tributyltin chloride on serum, liver, lung and kidney following subchronic exposure. **Food and Chemical Toxicology**, 64:335–343. 2014.
72. Moysés, M. R.; Barker, L. A.; Cabral, A. M. Sex hormone modulation of serotonin-induced coronary vasodilation in isolated heart. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, p. 949–958, 2001.
73. Nelson, J.F.; Felicio, L.S.; Randall, P.K.; Sims, C.; Finch, C.E. A longitudinal study of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: I. Cycle frequency, length and vaginal cytology. **Biology of reproduction**, v. 27, p. 327-339, 1982.
74. Oberdorster, E.; Rittschof, D.; Leblanc, G. A. Alteration of [¹⁴C]-testosterone metabolism after chronic exposure of *Daphnia magna* to tributyltin. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 34, p. 21–25, 1998.

75. Ogata, R., Omura, M., Shimasaki, Y., Kubo, K., Oshima, Y., Aou, S., Inoue, N. Two-generation reproductive toxicity study of tributyltin chloride in female rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, 63:127–144, 2001.
76. Ohhira, S.; Watanabe, M.; Matsui, H. Metabolism of tributyltin and triphenyltin by rat, hamster and human hepatic microsomes. **Archives of toxicology**, v. 77, p. 138-144. 2003.
77. Ohno S, Nakajima Y, Nakajin S. Triphenyltin and Tributyltin inhibit pig testicular 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity and suppress testicular testosterone biosynthesis. **Steroids**, 70:645–651. 2005.
78. Omura, M.; Ogata, R.; Kubo, K.; Shimasaki, Y.; Aou, S.; Oshima, Y.; Tanaka, A.; Hirata, M.; Makita, Y.; Inoue, N. Two-generation reproductive toxicity study of tributyltin chloride in male rats. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 64, p. 224–232, 2001.
79. Patin, S. A; Pollution and the Biological Resources of the Oceans, **Butterworth Scientific: London**, 1982.
80. Pereira-Fernandes, A., Vanparys, C., Hectors, T.L.M., Vergauwen, L., Knapen, D., Jorens, P.G., *et al.* Unraveling the mode of action of an obesogen: mechanistic analysis of the model obesogen tributyltin in the 3T3-L1 cell line. **Molecular and Cellular Endocrinology**. 370, 52–64. 2013.
81. Penza M, Jeremic M, Marrazzo E, Maggi A, Ciana P, Rando G, *et al.* The environmental chemical tributyltin chloride (TBT) shows both estrogenic and adipogenic activities in mice which might depend on the exposure dose. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 255:65–75. 2011.
82. Pereiro N, Moyano R, Blanco A, Lafuente A. Regulation of corticosterone secretion is modified by PFOS exposure at different levels of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in adult male rats. **Toxicology Letters**, 230:252–262. 2014.
83. Podratz, P. L.; Delgado Filho, V. S.; Lopes, P. F. I.; Sena, G. C.; Matsumoto, S. T.; Samoto, V. Y.; Takiya, C. M.; de Castro Miguel, E.; Silva, I. V.; Graceli, J. B. Tributyltin impairs the reproductive cycle in female rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 75, p. 1035-46, 2012.
84. Prossnitz E. R.; Novel roles for arrestins in the post-endocytic trafficking of G protein-coupled receptors. **Life Sciences**, v. 75, n. 8, p. 893-899. 2004.

- 85.Reiner, R. G. *et al.* A comparative study of lysosomal enzyme activity in monocytes and Kupffer cells isolated simultaneously in a rat model of liver injury. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 43, n. 2, p. 376–380, 1981.
- 86.Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. **Science**, 307:1625–1630. 2005.
- 87.Richard W. Hill, Gordon A. Wyse, Margaret Anderson. Reproduction. Em: **Animal Physiology**, 3ª edição. *Massachusetts: Sinauer Associate, 2012*
- 88.Richards J, Russel D, Ochsner S, Hsieh M, Doyle K, Falender A, Lo Y, Sharma S. Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation and luteinization. **Recent Progress in Hormone Research**, v.57, p.195-220, 2002.
- 89.Rodrigues, S.M.L., Ximenes, C.F., de Batista, P.R., Simões, F.V., Coser, P.H.P., Sena, G.C., Podratz, P.L., de Souza, L.N.G., Vassallo, D.V., Graceli, J.B., Stefanon, I. Tributyltin contributes in reducing the vascular reactivity to phenylephrine in isolated aortic rings from female rats. **Toxicology Letters**. 225:378–385. 2014.
- 90.Rossi EM, Marques VB, Nunes D de O, Carneiro MTWD, Podratz PL, Merlo E, *et al.* Acute iron overload leads to hypothalamic-pituitary-gonadal axis abnormalities in female rats. **Toxicology Letters**, 240:196–213. 2016.
- 91.Rubin, L.B.; Deane, H.W.; Hamilton, J.A. Biochemical and histochemical identification of 5-3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in the adrenal cortex and ovaries of diverse mammals. **Endocrinology**, 73, 784. 1963
- 92.Saitoh, M., Yanase, T., Morinaga, H., Tanabe, M., Mu, Y., Nishi, Y., Nomura, M., Okabe, T., Goto, K., Takayanagi, R., Nawata, H. Tributyltin or triphenyltin inhibits aromatase activity in the human granulosa-like tumor cell line KGN. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 289:198-204, 2001.
- 93.dos Santos, R.L., Podratz, P.L., Sena, G.C., Filho, V.S., Lopes, P.F., Gonçalves, W.L., Alves, L.M., Samoto, V.Y., Takiya, C.M., de Castro Miguel, E., Moysés, M.R., Graceli, J.B. Tributyltin impairs the coronary vasodilation induced by 17 β -estradiol in isolated rat heart. **Journal Toxicology Environmental Health A**. 75, 948-959. 2012.
- 94.Santos-Silva, A.P; Andrade, M.N.; Pereira-Rodrigues, P.; Paiva-Melo, F.D.; Soares, P.; Graceli, J.B.; Dias, G.R.M.; Ferreira, A.C.F.; de Carvalho, D.P.;

- Miranda-Alves, L. Frontiers in endocrine disruption: Impacts of organotin on the hypothalamus-pituitary-thyroid axis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 460, 246e257. 2018
95. Schoenfelder M, Schams D, Einspanier R. Steroidogenesis during in vitro maturation of bovine cumulus oocyte complexes and possible effects of tributyltin on granulosa cells. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, 84:291–300. 2003.
 96. Schwartz, N. B. Acute effects of ovariectomy on pituitary LH, uterine weight, and vaginal cornification. **American Journal of Physiology**, v. 107, p. 1251–1259, 1964.
 97. Sena GC, Freitas-Lima LC, Merlo E, Podratz PL, de Araújo JF, Brandão PA, Carneiro MT, Zicker MC, Ferreira AV, Takiya CM, de Lemos Barbosa CM, Morales MM, Santos-Silva AP, Miranda-Alves L, Silva IV, Graceli JB. Environmental obesogen tributyltin chloride leads to abnormal hypothalamic-pituitary-gonadal axis function by disruption in kisspeptin/leptin signaling in female rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, S0041-008X(17)30049-2. 2017.
 98. Shi, D.; Dyck, M.K; Uwiera, R.R.E; Russell, J.C; Proctor, S.D.; Vine, D.F. A Unique Rodent Model of Cardiometabolic Risk Associated with the Metabolic Syndrome and Polycystic Ovary Syndrome. **Reproduction Development**, 150(9):4425–4436. 2009
 99. Shi, H. H.; Huang, C. J.; Zhu, S. X.; Yu, X. J.; XIE, W., Y. Generalized system of imposex and reproductive failure in female gastropods of coastal waters in mainland China. **Marine Ecology Progress Series**, v. 304, p. 179-189, 2005.
 100. Si J, Han X, Zhang F, Xin Q, An L, Li G, *et al.* Perinatal exposure to low doses of tributyltin chloride advances puberty and affects patterns of estrous cyclicity in female mice. **Environmental Toxicology**, 27:662–70. 2012
 101. Sousa A. C.A., Coelho S. D., Ramiro Pastorinho M., Taborda-Barata L., Nogueira A. J.A., Isobe T., Kunisue T., Takahashi S., Tanabe S. Levels of TBT and other selected organotin compounds in duplicate diet samples. **Science of the Total Environment**. 574, 19–23. 2017.
 102. Spornitz, U. M.; Socin, C. D.; Dravid, A. A. Estrous stage determination in rats by means of scanning electron microscopic images of uterine surface epithelium. **The Anatomical Record**, v. 254, p. 116–126, 1999.

103. Tabb, M.; Blumberg, B. New modes of action for endocrine-disrupting chemicals. **Molecular endocrinology**, v.20, p. 475–82, 2006.
104. Taniguchi F, Couse JF, Rodriguez KF, Emmen JMA, Poirier D, Korach KS. Estrogen receptor- α mediates an intraovarian negative feedback loop on thecal cell steroidogenesis via modulation of Cyp17 α 1 (cytochrome P450, steroid 17 α hydroxylase/17,20 lyase) expression. **The FASEB Journal**, v.21, p.586-595, 2007.
105. USEPA (Environmental Protection Agency). Tributyltin oxide [Online] 1997. Toxicological review. <<http://www.epa.gov/iris/toxreviews/0349tr.pdf>> acessado em Maio de 2013.
106. Veldhuis, J.D., Carlson, M.L. and Johnson, M.L. The pituitary gland secretes in bursts: appraising the nature of glandular secretory impulses by simultaneous multiple-parameter deconvolution of plasma hormone concentrations. **Proceedings National Academy of Sciences of the USA**, 84, 7686–7690. 1987a.
107. Vos, J. G.; Dybing, E.; Greim, H. A.; Ladefoged, O.; Lambre, C.; Tarazona, J. V.; Brandt, I.; Vathaak, A. D. Health effects of endocrine disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. **Critical reviews in toxicology**, v. 30, p. 71–133, 2000.
108. Wada, O.; Manabe, S.; Iwai, H.; Arakawa, Y. Recent progress in the study of analytical methods, toxicity, metabolism and health effects of organotin compounds. **Sangyo Igaku**, v. 24, p. 24-54, 1982.
109. Wester, P. W.; Krajnc, E. I.; Van Leeuwen, F. X.; Loeber, J. G.; Van Der Heijden, C. A.; Vaessen, H. A.; Helleman, P. W. Chronic toxicity and carcinogenicity of bis(tri-n-butyltin) oxide (TBTO) in the rat. **Food and chemical toxicology**, v. 28, p. 179-196, 1990.
110. World Health Organization (WHO), 1990. IPCS, environmental health criteria 116, tributyltin compounds. WHO Offset Publication No. 38. WHO, Geneva.
111. Yamazaki T, Shimodaira M, Kuwahara H, Wakatsuki H, Horiuchi H, Matsuda H, *et al.* Tributyltin disturbs bovine adrenal steroidogenesis by two modes of action. **Steroids**, 70:913–921. 2005.
112. Yen, S. S. C. The human menstrual cycle. S. S. C. YEN & R. B. JAFFE (eds). **Reproductive Endocrinology**. Saunders. Philadelphia, PA, 126 p. 1978.

113. Zhang X.; Zhang C.; Shen S.; Xia Y.; Yi L.; Gao Q.; Wang Y. Dehydroepiandrosterone induces ovarian and uterine hyperfibrosis in female rats. **Reproductive biology**, 28, 3074–3085. 2013